Postverlagsort Berlin

FRESENIUS'
ZEITSCHRIFT
FÜR ANALYTISCHE CHEMIE

BEGRÜNDET VON REMIGIUS FRESENIUS

UNTER MITWIRKUNG DER FACHGRUPPE ANALYTISCHE CHEMIE
DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER
VERTRETEN DURCH
H. KIENITZ W. KOCH H. LUTHER H. SPECKER

HERAUSGEGEBEN VON

W. FRESENIUS UND A. KURTENACKER

180. BAND, 2. HEFT

MIT 22 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 10. APRIL 1961)

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

J.F. BERGMANN · MÜNCHEN

1961

Z. analyt. Chem.

Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie

Begründet 1862 und herausgegeben bis Band 20 (1881) von *C. Remigius Fresenius*, bis Band 36 (1897) von *C. Remigius* und *Heinrich Fresenius*, Band 37—58 herausgegeben von *Heinrich* und *Wilhelm Fresenius* und *Ernst Hinz*, Band 59 (1920) bis Band 105 von *Wilhelm Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 105 (1936) von *Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 106—127 (1944) von *Remigius Fresenius*, Band 128 (1948) herausgegeben von *A. Kurtenacker* und ab Band 129 (1949) von *W. Fresenius* und *A. Kurtenacker*. Bis Band 59 (1919) Wiesbaden, C. W. Kreidel, Band 59—62 (1922) Wiesbaden, C. W. Kreidel, und München, J. F. Bergmann, Band 63—127 (1944) München, J. F. Bergmann, ab Band 128 (1948) München, Bergmann und Berlin, Springer.

Die **„Zeitschrift für analytische Chemie"** erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in Heften, die zu Bänden vereinigt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 54,—. Sie bringt als „Originalabhandlungen" selbständige Untersuchungen aus allen Gebieten der analytischen Chemie.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskripts und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0,30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Der „Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie" enthält, zum Teil in Form von Sammelberichten, kritische Referate über die auf den einzelnen Gebieten an anderer Stelle veröffentlichten Arbeiten über analytische Chemie.

Originalarbeiten und alle sie betreffenden Zuschriften sind zu richten an die

Redaktion der Zeitschrift für analytische Chemie,
Wiesbaden, Kapellenstraße 11/15.

Für Originalabhandlungen wird ein Unkostenersatz von DM 32,— je Druckbogen, jedoch nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen für einen Beitrag vergütet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 40 Sonderdrucke.

Auf möglichst rasche Veröffentlichung der eingelaufenen Arbeiten wird besonderer Wert gelegt.

Springer-Verlag
Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 28—30
Fernsprecher 27901; Fernschreibnummer 04-61723
Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3
Fernsprecher 830301; Fernschreibnummer 01-83319

J. F. Bergmann
München 27, Trogerstraße 56
Fernsprecher 440535

Band 180 **Inhaltsverzeichnis** Heft 2

Originalabhandlungen

Seite

Scharpenseel, H. W., und K. H. Menke, Radiochromatographie mit schwachen β-Strahlern. I. Teil. Mit 5 Textabbildungen 81

Jentzsch, D., und K. Friedrich, Gaschromatographische Arbeitsmethoden. I. Die Anwendungsmöglichkeiten eines Flammenionisationsdetektors. Mit 15 Textabbildungen 96

Tewari, S. N., Detection of Arsenic, Antimony and Tin in Forensic Toxicology by Paper Chromatography 109

Urban, P. J., Colorimetry of Sulphur Anions. Part III. Determination and Evaluation of Polythionates above Trithionate 110

Urban, P. J., Colorimetry of Sulphur Anions. Part IV. Colorimetric Evaluation of Sulphur Sols 116

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Aus dem Institut für Bodenkunde der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Mückenhausen) und dem Institut für Tierzucht und Tierfütterung der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. Havermann)

Radiochromatographie mit schwachen β-Strahlern

I. Teil

Von
H. W. Scharpenseel und K. H. Menke

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. April 1960)

Die erste Periode radioaktiver Tracerversuche stand vornehmlich im Zeichen von Einwanderungs-, Austausch- und Bilanzstudien vielgestaltigster Art, bei denen das markierende Isotop meist durch die Strahlungsmessung unmittelbar zum Ergebnis der experimentellen Fragestellung hinleitete. Inzwischen ist man längst dazu übergegangen, nurmehr in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten weitgehend definierte (wenn auch nicht notwendig exakt identifizierte) aktive Abbau- oder Umwandlungsprodukte der in einen bestimmten Reaktionsablauf verabfolgten markierten Substanz zu messen nach ihrer vorherigen Abtrennung mittels konventioneller chemischer Methoden. Durch Vergleich der Anteile verschiedener Reaktionsprodukte nach zeitlich gestaffelter, mehrfach wiederholter Abtrennung und Aktivitätsmessung läßt sich vieles über das Verhalten der einzelnen Fraktionen innerhalb des Gesamtreaktions- oder Stoffwechselverlaufs ableiten.

Ebenso häufig wird man nicht die eigentlich interessierende Verbindung markieren, sondern radioaktive Formen ihrer vermuteten Vorläufer in sie umzuwandeln versuchen, oder man wird die Verbindung der Degradation unterwerfen und erst danach die vermuteten Abbauprodukte in bekannter spezifischer Aktivität zusetzen, um durch gemeinsame Abtrennung der inzwischen umgebildeten „Vorstufe" mit der inaktiven Verbindung, oder aber der aktiven Substanz mit dem entstandenen inaktiven Abbauprodukt die Richtigkeit des vermuteten Reaktionsmechanismus zu bestätigen.

All diese heute üblichen Ansätze ruhen, abgesehen von der Strahlungsmeßtechnik selbst, weitgehend auf 3 Säulen:

1. Spektroskopische Identifizierungen (UV, sichtbar, IR);

2. Isotopenverdünnungsmethode und Konstanz der spezifischen Aktivität nach wiederholtem Umfällen und Umkristallisieren unter Hinzuziehung der Schmelzpunktidentität;

3. Cochromatographie zwischen radioaktiver Verbindung und inaktiver Trägersubstanz.

Chromatographisch-radiologische Verbundmethoden sind namentlich im Bereich der meist nichtkristallinen biologischen Substrate absolut vorherrschend und in ständiger Bedeutungszunahme begriffen, wobei der Schwerpunkt auf I. Radiopapierchromatographie, II. Radiogaschromatographie und III. Radiosäulenchromatographie liegt.

I. Radiopapierchromatographie

Die kombinierte papierchromatographische Trennung und radiologische Messung mit γ- oder harten β-Strahlern markierter Substanzen ist verhältnismäßig einfach durchführbar. Hais[17] gibt eine Zusammenfassung früherer Ergebnisse, während Senyavin[40] u. Mitarb. die prinzipiellen statischen und kinetischen Vorgänge der chromatographischen Auftrennung radioaktiver Substanzmischungen behandeln und Rossi[35] einen Überblick der radiopapierchromatographischen Meßtechnik vermittelt. Neben dem üblichen eindimensionalen Abtasten der Fleckenzeichnungen eines Chromatogrammstreifens mit Geiger-Müller-[7,12,45] sowie Plastik- oder NaJ-Scintillationszählern[44] kam es zur Entwicklung spezifischerer Ansätze. Gilbert u. Keene[13] bedienen sich zum schnellen Abtasten zweidimensionaler Chromatogramme ($^1/_4$ Bogen) einer mit 1 cm Abstand linear aneinandergereihten Serie von 30 G.-M.-Zählrohren, welche die beim Überstreichen der Papierstreifen individuell aufgenommenen Ladungen in zugeordneten Kondensatoren speichern und dann über ein Elektrometer proportional der von den einzelnen Zählrohren aufgenommenen Aktivitäten protokollieren (maximale Empfindlichkeit 10^{-11} Curie). Aronoff[1] löste das Problem der zweidimensionalen Radiopapierchromatographie durch Abtasten des auf eine rotierende Trommel aufgespannten Papierbogens mit Hilfe eines durch eine spiralige Welle bewegten Zählrohrfühlers.

Andere Autoren[2] benutzten die durch Filmschwärzung gemessene Lichtemission, welche die Radioaktivität eines Chromatogramms in einem Halogen-G.-M.-Zählrohr verursacht, als Maß für die Strahlungsintensität der verschiedenen chromatographischen Zonen (siehe auch[24]), oder kombinierten, wie Durrum u. Gilford[9], die mit einem G.-M.-Zählrohr durchgeführte Aktivitätsmessung mit der Extinktionsmessung eines durch Quarzprisma gefilterten monochromatischen Lichtbündels in einer gegen das Zählrohr austauschbaren Photozelle. Die Aktivierung des bereits entwickelten Papierchromatogramms durch Neutronenbestrahung wird von Benson[5] sowie Winteringham[51] einschließlich der dann folgenden Aktivitätsmessung beschrieben. Der letzte Autor untersuchte auch die nachträgliche Aktivierung der papierchromatographischen Fleckenzonen auf chemischem Wege, z. B. durch Methylierung von getrennten Aminosäuren mit $CH_3{}^{131}J$.

In diese Kategorie gehört auch die radiopapierchromatographische Messung verschiedener inaktiver Fettsäuren einschließlich der Bestimmung ihres Sättigungsgrades durch Eintauchen des Chromatogramms in $Na^{131}J/Na^{131}JO_3$-Lösung, wonach das ^{131}J außerhalb der Fleckenzonen durch anschließende Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure wieder entfernt wird[6]. Mangold u. Mitarb.[27] benutzen verschiedene aktive Verbindungen (α-Dextrinjod, Jod, Bleitetraacetat) als Markierungspunkte in der papierchromatographischen Untersuchung von Fettstoffen.

Radiopapierchromatographie energieschwacher β-Strahler wie ^{35}S, ^{14}C und ^{3}H mit Endfenster-G.-M.- oder -proportionalzählrohr ist unergiebig. Wegen ihrer außergewöhnlichen Bedeutung wurden jedoch schon früh erfolgreiche Versuche zu ihrer radiochromatographischen Erfassung unternommen, wie von Benson, Calvin u. Mitarb.[4] zur Identifizierung der photosynthetischen Intermediären.

Kuzin u. Tokarskaya[25] unterwarfen die Stoffgruppen totalmarkierter Organismen der papierchromatographischen Trennung und beobachteten die durch Variation der Rahmenbedingungen eintretenden Verschiebungen der aktiven Fraktionsanteile als Ausdruck des zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus.

Winteringham[18,51,55] beschäftigte sich intensiv mit allen das radiopapierchromatographische Meßergebnis beeinflussenden Parametern. Er konstruierte zunächst einen eindimensionalen[50], später einen 4π-β-Radiopapierchromatographen[18]. Das letztere aus 2 hemizylindrischen, in einer Pyrexhülle, parallel angeordneten Zählrohren bestehende Modell erlaubt von außen her ein stufenweises Durchziehen des aufgespulten Papierstreifens. Es ergab mit Gas gefüllt und in Koinzidenz geschaltet einen Nulleffekt von 25 IpM (Impulse pro Minute) sowie die folgenden Ausbeuten für ^{14}C und ^{3}H: ^{14}C auf dem Papier (8,8 mg/cm^2) = 32%; ^{3}H auf dem Papier (9,3 mg/cm^2) = 0,22%.

Dies ist im 4π-Gerät für ^{14}C etwa 8mal so hoch wie die etwa 4%ige Ausbeute, die ein Endfensterzählrohr von 2 mg/cm^2 erlaubt. Der nicht vom Papier absorbierte Anteil der β-Aktivität des ^{14}C beträgt bei 8,8 mg/cm^2 Papiermächtigkeit etwa 37%[51].

Roberts u. Carleton[34] entwarfen ein automatisch registrierendes Modell, welches im Falle ^{14}C-markierter Zucker eine direkte Bestimmung der *spezifischen* Aktivität aller abgetrennten Verbindungen ermöglicht.

Obschon zum Abtasten schwach strahlender β-Radiopapierchromatogramme gewöhnlich dem Q-Gas- oder Methan-Durchflußzähler, fensterlos wie auch mit Mylar- oder Goldfenster, der Vorzug gegeben wird, fanden Steenberg u. Benson[43] auch großflächige Scintillationszählrohre gut geeignet für die autoradiographische Erfassung und das formgetreue Abtasten irregulärer Flecken von ^{14}C, ^{35}S und ^{45}Ca. Wilson[47] unterwarf Tritiumchromatogramme der Flüssigkeitsscintillations-Autoradiographie. Da infolge der sehr starken Absorption der Tritiumstrahlung durch das Papier (> 90%) eine direkte Autoradiographie kaum eine Zeichnung ergibt, wurde das Chromatogramm zunächst kurz in eine 0,3%ige Lösung von p-Terphenyl in Toluol getaucht und anschließend mit hochempfindlichem Film bedeckt, der nunmehr die durch den organischen Scintillator erzeugten Lichtquanten an Stelle der direkten β-Strahlung registriert.

UV-sensitive Substanzen lassen sich einer UV-Radiopapierchromatographie unterwerfen. Price u. Hudson[32] fanden, daß Halophosphatfluoroskope und Geiger-Zählrohr ε mit Edelstahlkathode sensitiv sind gegenüber UV-Licht und unempfindlich für die höheren Wellenlängen, wie sie ebenfalls von UV-Lampen abgestrahlt werden. Papierchromatogramme mit UV-sensitiven Substanzflecken werden daher zwischen einer UV-Lichtquelle und einem Zählrohr durchbewegt zur quantitativen Messung der verschiedenen Fraktionen.

Tabelle 1
Ausbeute bei Radiopapierchromatographie mit Methandurchflußzähler

Isotop	Ausbeute	
	fensterlos	Goldfenster
^{35}S	21,3	2,8
^{14}C	17,17	1,85
^{3}H	1,52	—

Die eleganteste Form eines zweidimensionalen „Scanners" benutzt ein Zeilenabtastsystem, wobei mit einer gewissen, konstanten Untersetzung für eine Anzahl von Pulsen ein Punkt gedruckt wird. Ähnlich ergibt sich durch gleiche Dimensionierung von Papierchromatogramm und Arbeitsbreite einer elektronischen zählrohrgesteuerten Schreibmaschine ein dem Chromatogramm deckungsgleiches Blatt, welches die regionale Verteilung der reihenweise abgetasteten Aktivität unmittelbar in IpM aufgedruckt erhält[31].

Eigene Untersuchungen mit ^{35}S-Methionin, ^{14}C-Benzoesäure und ^{3}H-Purpurogallin ergaben die in Tab. 1 dargestellten Meßausbeuten bei

Verwendung eines fensterlosen Methandurchflußzählers mit federnd gelagerter Druckplatte, die den Papierstreifen zur Abdichtung gegen die angeschraubte Schlitzblende des Zählrohrs preßt, wie auch andererseits eines Goldfensters von 0,88 mg/cm², das jedoch im Falle des Tritiums mit seiner Reichweite von 0,7 mg/cm² Al (0,1 μ Al Halbwertsdicke) zur totalen Absorption der β-Strahlung führte. Dies bessert sich auch durch Verwendung der noch dünneren Mylarfolie nur unwesentlich. Bei ^{14}C ergab das Zwischenschalten des Goldfensters, das eine erhebliche Ersparnis an Methangas bedeutet, eine Minderung der Meßausbeute von 89,2%, bei ^{35}S von 86,8%.

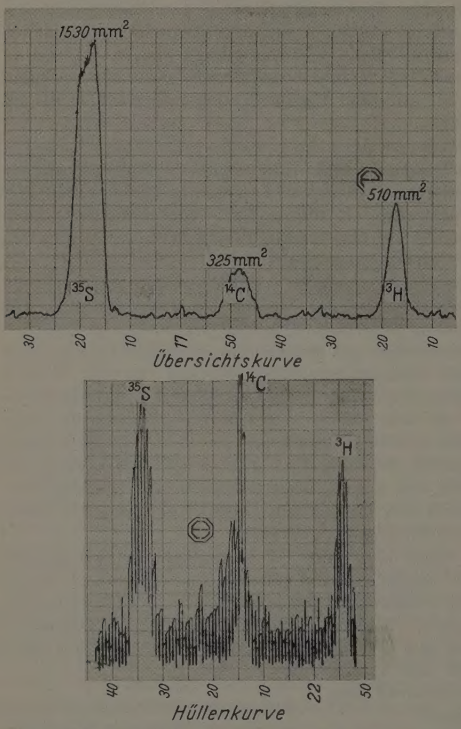

Abb. 1. Radiopapierchromatogramm von ^{35}S, ^{14}C und ^{3}H. Übersichts- und Hüllenkurve

Die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten erfolgte durch schrittweises Abtasten mit Impulsvorwahl und Zeitdrucker bei nachfolgender Summierung der Einzelzählraten je 1 min abzüglich des Nulleffektanteils.

Abb. 1 zeigt die Aktivitätsgipfel aufgetragener ^{35}S-, ^{14}C- und ^{3}H-Flecken, und zwar einmal als Übersichtsdiagramm, ein zweites Mal als eine Art Hüllenkurve. Bei letzterer wird das Schreibpapier durch Anhängen des Schreibers an den Radiopapierchromatographen ebenfalls schrittweise transportiert*, jeweils nach Auszählen einer vorbestimmten Impulsrate, wobei durch einen angeschlossenen Zeitdrucker die bei den einzelnen Schritten benötigten Meßzeiten registriert werden, und die höchsten Schreiberausschläge

* Nachträglicher Anbau an Frieseke & Hoepfner Radiopapierchromatopraphen FH 452.

innerhalb der einzelnen Meßabschnitte die höchste im Verlauf der jeweiligen Periode bei 20 sec Dämpfung registrierte Meßrate repräsentieren.

Die Übersichtsdiagramme werden meist mit einer zusätzlich eingebauten Gesamtdämpfung von 2 min gefahren*. Abb. 2 zeigt, daß auch beim energieschwachen Tritium — substanzarme Lösungen vorausgesetzt — eine angenäherte Proportionalität zwischen aufgetragener Aktivitätsmenge und erzielter Impulsrate besteht ohne radikale Selbstabsorptionsverluste.

Neben den Arbeitsmerkmalen des Methandurchflußzählers wurde auch die Einsatzmöglichkeit eines Koinzidenz-Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometers, wie es im Prinzip durch HAYES, HIEBERT u. Mitarb.[20,23]

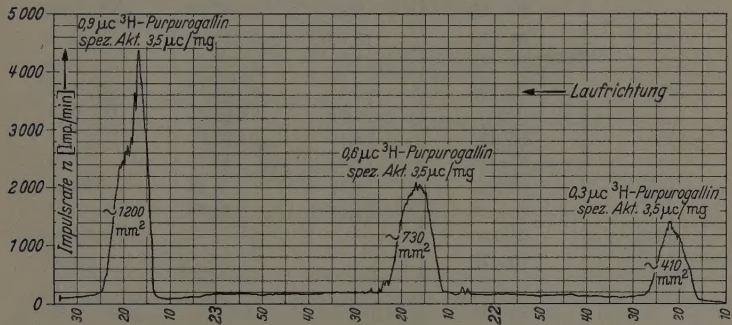

Abb. 2. Ungefähre Proportionalität zwischen aufgetragener Tritiumaktivität und Fläche unter der Kurve

zugrunde gelegt wurde und inzwischen fast für alle Aufgaben der Strahlungsmeßtechnik Verwendung findet[36], zu Zwecken der Radiopapierchromatographie geprüft. Ein ^{14}C- oder ^{35}S-belegter Papierstreifen zwischen zwei Platten oder Folien von Plastik-Scintillator** ergibt unmittelbar zwischen die Photomultiplier eines Koinzidenz-Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometers gebracht, eine etwa 20%ige Ausbeute.

Andererseits liefert auch ein Papierstreifen, der kurz in eine Lösung von 0,3% BPO (2,5-Diphenyloxazol) + 0,05% POPOP (2,2'-p-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)) in Toluol getaucht wird, den Photomultipliern meßbare Scintillationen, wobei die Anwesenheit des Papierstreifens zwischen den 2 in Koinzidenz geschalteten Photomultipliern bei allseitig wirksamem Reflektor keine Auslöschung der einseitig emittierten Scintillationen bewirkt. Ob dies dem Einfluß von Reflexion und Streuung der gebildeten Lichtblitze zuzuschreiben ist, oder ob der unter optimalen

* Nachträglicher Anbau an Frieseke & Hoepfner Radiopapierchromatographen FH 452.

** Plastic Scintillator NE 102 Thin Sheet, Nuclear Enterprises Ltd, Edinburgh.

Bedingungen, z. B. in Toluol, nach Post[33] etwa 5 m betragende mittlere freie Lichtpfad ausreicht, die Lichtblitze auch dem Photomultiplier auf der abgewandten Seite des Papiers sichtbar zu machen, mußte durch entsprechende allseitige Abschirmung noch untersucht werden. Es zeigte sich, daß sowohl Reflexion wie direkte Lichtdurchdringung des Papiers wirksam sind. Die Ausbeute bei der Messung von Tritium sinkt am

Tabelle 2. *Ausbeute bei Radiopapierchromatographie nach Eintauchen in flüssigen Scintillator; Messung im Koinzidenz-Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer*

FMP-Spannung V	Meßkanalbreite V	Ausbeute (%)		
		^{35}S	^{14}C	^{3}H
820	10—50	8,04	7,10	0,003
	10—75	9,92	7,96	0,003
900	10—50	18,96	14,12	0,06
	10—75	21,0	17,4	0,045
980	10—50	23,6	18,13	0,35
	10—75	31,08	24,86	0,41
1060	10—50	22,16	20,9	1,21
	10—75	29,64	28,13	1,23
1140	10—50	16,32	15,88	2,14
	10—75	24,12	24,58	2,35
1220	10—50			2,27
	10—75			3,08
1300	10—50			2,03
	10—75			3,57
1380	10—50			1,1
	10—75			1,93

stärksten durch totale Abschirmung des Reflektors. Sie beträgt bei 1060 V Photomultiplierspannung nur mehr 24% der normalen Meßrate, was mit zunehmender Spannung bis 1220 V bis auf 35% ansteigt. Bei ^{35}S und ^{14}C spielt wegen der stärkeren Scintillationsblitze die Abschirmung eine geringere Rolle. Bei 900 V beträgt die Meßrate noch 50% der Normalausbeute, bei 1060 V erreicht sie schon 92% der normalen Ausbeute mit unabgeschirmtem Reflektor.

Zur Erzielung reproduzierbarer Aktivitätsmeßraten von den aktiven Papierstreifen muß dem Gefriertrocknungseffekt im Innern der Tiefkühltruhe, welche die Photomultiplier beherbergt, entgegengewirkt werden. Dies geschieht durch Tränken der Papierstreifen in Toluol + DPO + POPOP-Lösung, welche zur Vermeidung eines trocknungsfördernden Temperaturgradienten auch bereits tief gekühlt sein sollte. Der Streifen wird dann in einen aufgeschlitzten Korkstopfen oder angesägten Holzwürfel innerhalb einer verschließbaren Küvette oder eines Flüssigkeits-Scintillationsfläschchens mit Schraubdeckel (20 ml) eingesetzt. Die planparallelen Flächen der Küvette bieten den Vorteil eines

unmittelbaren optischen Kontakts mit den Fenstern der Photomultiplier. Die Verwendung von Scintillationsfläschchen empfiehlt sich beim Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometermodell mit automatischem Probenwechsler, da hier ein Papierchromatogramm, in schmale Streifen zerlegt und in mehrere Fläschchen eingesetzt, gleich über den Wechsel der Proben durchgemessen sowie bei Anschluß eines Ratemeters und

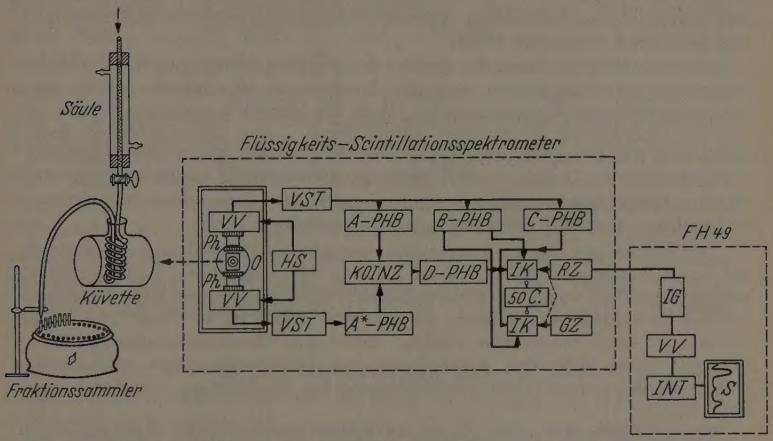

Abb. 3. Blockdiagramm für Zusammenschalten von Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer mit Zählwerk, Integrator und Schreiber eines FH 49-Strahlungsmeßgeräts. *O* Optische Kammer; *Ph* Photomultiplier; *VV* Vorverstärker; *HS* Hochspannung; *VST* Verstärker; *PHB* Pulshöhenbegrenzer; *IK* Impuls(Zähl)kanal; *KOINZ* Koinzidenzschaltung; *50 C.* 50 Hertz-Probe; *RZ* Rotes Zählwerk; *GZ* Grünes Zählwerk; *IG* Impulsgenerator; *INT* Integrierwerk; *S* Schreiber

Schreibers (Abb. 3) als „Treppenkurve" aufgezeichnet werden kann. Die aus Tab. 2 erkennbare hohe Meßausbeute macht diese radiopapierchromatographische Technik durch Flüssigkeits-Scintillationsmessung namentlich für schwache β-Strahler bedeutsam. Die Aufteilung eines Chromatogrammstreifens in mehrere Fläschchen nimmt kaum mehr Zeit in Anspruch als das Einlegen des Chromatogramms in einen fensterlosen „Scanner".

II. Radiogaschromatographie

Neben der Radiopapierchromatographie ist seit etwa 1956 eine Kombination von Gaschromatographie und Strahlungsmessung versucht worden, die zunächst einmal namentlich durch Willard u. Mitarb.[11,16] zur Untersuchung von Rückstoßvorgängen und den hierdurch eingeleiteten chemischen Reaktionen sowie zur Trennung trägerfreier Mischungen niedrig siedender Bestrahlungsprodukte (wie z. B. n-Propylbromid) Verwendung fand. Auf diese Weise gelingt es, auch materiell geringfügige Mengen von Nebenprodukten und Artefakten quantitativ zu ermitteln.

Herr u. Mitarb.[21,22] machten sich in ähnlicher Weise die energiereiche γ-Strahlung von ^{82}Br zunutze zur radiogaschromatographischen Identifizierung von Neutronen-bestrahlten Alkylhalogeniden, wie zum Studium des Effekts von

„Aminscavengern" auf die Retention des ^{82}Br durch die Alkylhalogenide. Für die Strahlungsmessung zeigte sich, wie zu erwarten, eine von Trägergas und Substanzfraktionen durchflossene Glasschnecke auf dem Meßkopf eines Scintillationszählers der alternativ geprüften Verwendung eines Gasdurchflußzählers mit eingeschmolzener Glascapillare für den Durchtritt von Trägergas und Fraktionen in der Meßausbeute überlegen. Darüber hinaus ist der Scintillationszähler wegen seines hohen Auflösungsvermögens von 10^{-8} sec gegenüber 10^{-4} sec beim Gaszählrohr besser geeignet zum Auffangen der plötzlichen Aktivitätsstöße durch die hohe spezifische Aktivität der reaktorbestrahlten Substanzfraktionen und ergibt ebenmäßige Gipfel von angenähert Gaußscher Form.

Glückauf[14] untersuchte den Einfluß der Temperaturerhöhung, die sich durch Aufbringen hochradioaktiver Gase mit Energien im Wattbereich für die gaschromatographische Trennung ergibt. Durch den lokalen Temperaturanstieg zeigt sich die Tendenz, daß die hinteren Anteile der zu einem Gipfel gehörigen Fraktionen eine Wanderungsbeschleunigung erhalten und stark nach vorn hin aufholen, wodurch eine Kontraktion und Verengung der einzelnen Gipfel entsteht. Die Gaschromatographie ist daher bestens geeignet zur präparativen Aufarbeitung und sauberen Trennung unter Heißlaboratoriumsbedingungen.

Die sich bei der Gaschromatographie radioaktiver Verbindungen, namentlich des unteren Massenbereichs, wie bei ^{3}H und ^{14}C, ergebenden Isotopeneffekte, welche namentlich bei kombinierten radiogaschromatographischen Identifizierungsarbeiten bedeutsam sein können, wurden von Wilzbach u. Riesz[49], z. B. am Cyclohexan, einer eingehenden Prüfung unterzogen. Die Autoren benutzten hierbei zum ersten Male eine Kombination von Gaschromatograph und Durchflußionisationskammer-Vibrationselektrometer für die Messung von Tritiumverbindungen.

Für die radiogaschromatographische Arbeit mit schwachen β-Strahlern wie ^{35}S, ^{14}C und ^{3}H wurden bisher vornehmlich 2 Ansätze erprobt:

Wolfgang u. Rowland[52] mischten das Trägergas (Helium) am Ausgang des Gaschromatographen in konstantem Mischungsverhältnis mit Zählgas (Methan) und leiteten dieses Gemisch mit den getrennten Substanzfraktionen zum Zwecke der Aktivitätsmessung über einen internen Proportionaldurchflußzähler. Hier können noch 50 Disintegrationen/sec bei 20 ml Zählrohrvolumen und 1 ml/sec Gasdurchfluß mit $\pm 5\%$ Genauigkeit registriert werden.

Mason, Dutton u. Bair[28] konstruierten eine Durchflußionisationskammer von 10 ml aktivem Volumen, zum großen Teil aus Teflon, so daß sie gemäß der Hitzebeständigkeit dieses Materials bis zu Arbeitstemperaturen von 240° C Verwendung finden kann. Bei einem Gasdurchfluß von 40—50 ml ergibt sich je Minute eine etwa fünfmalige Gaserneuerung, was dieser Konstruktion beim Aufschluß an ein Vibrations-Elektrometer mit umschaltbaren hochohmigen Widerständen von 10^{8}—10^{12} Ohm eine Operationsbreite vom mc-Bereich bis hinunter auf 10^{-2} μc verleiht. Baxter u. Keen[3] zeigen ein bemerkenswertes gaschromatographisches Arbeitssystem für aromatische Verbindungen bis hinauf zu 430° C, was jedoch einen Ersatz des Teflons durch Metall und Glas erforderlich macht. Dutton u. Mitarb.[10] konnten mit Hilfe ihres kombinierten Gaschromatograph-Ionisationskammer-Vibrationselektrometer-Gerätes nachweisen, daß die Tritium-Rückstoßmarkierung durch Exposition gegen Tritiumgas bei ungesättigten Verbindungen zur Bildung hydrierter gesättigter Homologe führen kann, die dann bei der gaschromatographischen Abtrennung den größten Teil der Aktivität enthalten.

Die höchste Meßausbeute, wenn auch nicht in kontinuierlicher Arbeitsweise, erzielten wir mit dem Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer.

Zunächst bedarf es der Messung der Verzugszeit zwischen Beginn der Gipfelaufzeichnung durch den Schreiber des Gaschromatographen und Erscheinen der radioaktiven Front im Trägergas, einer im allgemeinen kurzen Frist von einigen Sekunden, die beim Auswechseln der Scintillationsgläschen beobachtet werden muß. Diese stehen über einem Bad von Trockeneis und Trichloräthylen ($-80°$ C), sind je nach der Löslichkeit des gaschromatographisch getrennten Materials mit 15 ml Toluol + 0,3% DPO + 0,05% POPOP, oder mit 9 ml Toluol + 0,3% DPO + 0,05% POPOP + 6 ml Äthanol gefüllt, zur Vermeidung der Löschwirkung molekularen Sauerstoffs unter Vakuum entgast[39] und empfangen die im Trägergasstrom befindlichen Substanzfraktionen durch eine feine Glascapillare unmittelbar hinter dem beheizten Ausgang des Gaschromatographen, um ein Auskondensieren der vergasten Substanzen vor Eintreten in das Scintillationsfläschchen zu verhindern. Auf diese Weise wurden bei ^{14}C- und ^{3}H-Benzoesäuremethylester nach Trennung über eine Siliconsäule die folgenden Ausbeuten erzielt: ^{14}C-Benzoesäuremethylester in Toluol + DPO = 63,3%; ^{3}H-Benzoesäuremethylester in Toluol + DPO + POPOP = 11,9%.

Dieser Weg, die Gipfelfraktionen aufzufangen und im Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer zur Messung zu bringen, ist für schwache β-Strahler in niedriger Konzentration (bis 10^{-4} μc), wie allgemein bei Verwendung gaschromatographischer Systeme mit geringer Dosisbemessung vorzuziehen. Hier wird vor allem an das Arbeiten mit Capillarsäulen, Argon-Ionisations-Detektoren nach LOVELOCK[26]*, ** und Flammenionisationssystemen[38,46]**, wo vornehmlich Probevolumina von 0,025—0,5 μl Verwendung finden, gedacht.

Wir erprobten außerdem ein kontinuierlich arbeitendes System unter Verwendung des Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometers als Strahlungsdetektor. Durch eine Teflonverbindung wurde der Gasaustritt des Meßkreises am Gasofract*** über einen kurzen, durch Asbestpapier umwickelten Plastikschlauch (1 mm innerer ⌀) mit einer Spule von Plastik-Scintillatorschlauch (0,7 mm innerer ⌀) (Abb. 5) verbunden, welche zwischen den Photomultipliern des Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometers* befestigt war. Da dieses über keinen Integratorteil und Schreiberanschluß verfügt, wurde es mit dem FH 49-Strahlungsmeßgerät sowie über dessen Ratemeterteil und Schreiberanschluß mit einem Kompensationsschreiber verbunden (Abb. 3). (Transistor 2 N 427 rot TP 22

* W. G. Pye & Co., Ltd. Granta Works, Cambridge, England.

** Shandon Scientific Company Ltd. 6 Cromwell Place, London S. W. 7, England.

*** Dr. Virus K.G., Bonn, Rheinweg.

* Packard Instrument Comp., La Grange, Illinois, USA.

der Zählwerksendstufe rot des TRI CARB Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometers wurde über Kondensator, Tuchelbuchse und abgeschirmtes Kabel in das FH49 gebracht und über Impulstrafo und Vorverstärker mit Ratemeter und Dekadenzähler synchronisiert.)

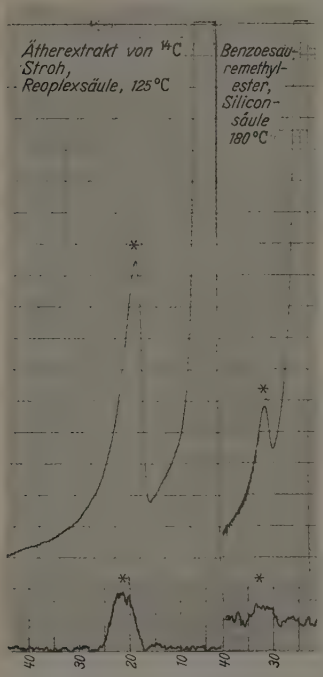

Abb. 4. Radiogaschromatographie mit Spule aus Plastik-Scintillatorschlauch

Abb. 4 zeigt die Wärmeleitfähigkeits- und Aktivitätsgipfel, die von Fett allseitig ^{14}C-markierten Strohs bei 125° C an einer Sterchamol-Reoplex-Säule und von ^{14}C-Benzoesäuremethylester bei 185° C an einer Siliconsäule erzielt wurden. Bei 125° C Betriebstemperatur reichte die Asbestisolierung offenbar noch aus, um eine Kondensation der Substanz während des etwa 1 sec dauernden Transports durch die Kühltruhe zur Plastik-Scintillatorspule hin zu verhindern, während höher siedende Substanzen, die bei höheren Temperaturen gefahren werden müssen, bereits zum größten Teil vor Erreichen von Plastikspule und Photomultiplier auskondensieren, wie durch Auffangen der Proben in Toluol und DPO hinter der Plastik-Scintillatorspule und Aktivitätsmessung in der flüssigen Phase bestätigt wurde. Diese Methode ist wegen ihrer geringen Reichweite für Tritiumproben nur begrenzt anwendbar, da nur höhere Aktivitäten einen Gipfel ergeben, diese aber einen erheblichen Memoryeffekt aufbauen. Ansonsten erzielt der Plastik-Scintillatorschlauch (siehe S. 92) für ^{14}C in Gasform etwa 60% Meßausbeute bei einem Auflösungsvermögen von 3,5 sec^{-9} und einer Hauptemissionsbande von 4300 Å.

III. Radiosäulenchromatographie

Wegen ihrer fast unbegrenzten Anwendbarkeit dürfte der Kombination von Säulenchromatographie und Aktivitätsmessung in steigendem Maße Bedeutung zukommen. Glückauf[15] untersuchte die Theorie der Ionenanreicherung durch Säulenchromatographie. Wenn die Logarithmen der regionalen Verteilungskoeffizienten auf der Ordinate, die Anteile der eluierten Substanzmischung in Wahrscheinlichkeitsskala auf der

Abszisse abgetragen werden, kommt dem Kurvengradienten die Dimension $\delta\sqrt{N}$ zu, wobei δ dem Verteilungskoeffizienten minus 1 entspricht und N die Anzahl der theoretischen Böden in der Säule darstellt.

Eine einfache Form der Aktivitätsüberwachung des Eluats chromatographischer Säulen durch ein G.-M.-Zählrohr wird von Dobbs[8] in Vorschlag gebracht. Menke[29] leitete das ^{60}Co-haltige Eluat der in einer Dowex 50-Säule getrennten Vitamin B_{12}-Analoge anschließend durch eine Plastikschlauchspirale, die dem Meßkopf eines Scintillationszählers aufgelegt war. Schram u. Lombaert[37] benutzten ebenfalls einen Scintillationszähler zur kontinuierlichen Messung von ^{14}C- und ^{35}S-Säuleneluaten. Sie breiteten diese in dünner Schicht über einen Plastik-Scintillator, der zur Erniedrigung des Nulleffekts an eine Koinzidenzstufe geschlossen war. Die erzielte Meßausbeute entsprach der eines G.-M.-Endfensterzählrohres ohne Selbstabsorptionsverluste.

Harrison[11] vergleicht die Lichtausbeute und Zerfallszeit der Scintillationen für flüssige und Plastik-Scintillatoren mit Anthracen:

	Lichtausbeute	Zerfallszeit (mμsec)
Antracen	100	32
Plastik	50	2
Flüssig	70	2

Er errechnet nach der Postschen[33] Beziehung $\frac{1}{\Delta t} = \frac{N}{\tau}$ (N = Lichtausbeute, τ = Zerfallszeit, Δt = Ungenauigkeit der zeitlichen Erfassung der Pulse bei schneller Aufeinanderfolge) für flüssige Scintillatoren ein $\frac{N}{\tau}$ von 35, für Plastik-Scintillatoren von 25. Da die Plastik-Scintillatoren der Nuclear Enterprises inzwischen ebenfalls 65% der Lichtausbeute des Anthracens erzielen, dürfte das Auflösungsvermögen bei schneller Pulsfolge für Flüssigkeits- und Plastik-Scintillatoren etwa gleich sein.

Bei Vorhandensein eines guten Reflektors ist die Weite des Luftabstandes zwischen Photomultipliern und Scintillatorschlauchspule innerhalb 1—3 cm unbedeutend für das Meßergebnis. Bei Einbringen der Spule in eine Siliconöl-gefüllte Quarzküvette (Abb. 5), die in direktem optischem Kontakt den Photomultipliern angepaßt ist, ergibt sich eine Erhöhung der Meßrate um 10—50%. Scintillatorschlauchspule und -spirale zeigen auf gleiches Meßvolumen umgerechnet nur unwesentliche Unterschiede in der Meßausbeute. Tritium wird nur sehr schlecht registriert, wobei jedoch Zugabe einer Spur von wasserunlöslichem POPOP mindestens eine Verdopplung der Meßrate erbringt (Tab. 3).

Es wurden nun verschiedene Substanzen, eine ^{35}S-Methioninprobe sowie die 6 n HCl-Hydrolysate einer biosynthetisch in $^{14}CO_2$ erstellten

Strohprobe* und einer nach Wilzbach[48] Tritium-markierten Braunhuminsäureprobe durch eine Dowex 50 x 8-Ionenaustauschersäule ge-

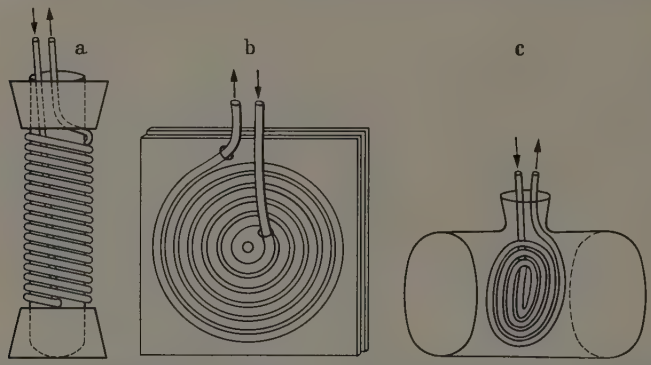

Abb. 5. Plastik-Scintillatorschlauch-Spulen und -Spiralen. a Spule. Volumen 0,3—0,5 ml; b Spirale. Volumen 0.3 -0.5 ml; c Spirale in Quarzküvette mit Siliconöl für direkten optischen Kontakt. Volumen 0,3—0,5 ml

geben und nach Moore u. Stein[30] mit verschiedenen Citratpuffern, denen wir am Ende noch einen Phosphatpuffer von p_H 8,6 und einen Veronalpuffer von 10,2 folgen ließen, eluiert.

Tabelle 3.

Meßausbeute von ^{35}S, ^{14}C und ^{3}H bei Variation von Photomultiplierspannung und Breite des Meßkanals in verschiedenen Plastikscintillatorschlauch-Spulen und -Spiralen

PMP-Spannung V	Meßkanal V	^{35}S (Ausbeute %)			^{14}C (Ausbeute %)			^{3}H (Ausbeute %)		
		Spule	Spirale	Spule in Siliconöl	Spule	Spirale	Spule in Siliconöl	Spule $\times 10^{-2}$	Spirale $\times 10^{-2}$	Spule in Siliconöl $\times 10^{-2}$
820	10—50	3,52	2,5	3,43	4,64	4,2	4,77	2,0	1,34	2,3
	10—75	3,54	2,61	3,61	5,0	4,5	4,76	2,4	1,37	2,2
900	10—50	*5,85*	5,20	5,62	*4,71*	*4,69*	*4,87*	*2,1*	1,34	2,0
	10—75	6,59	5,76	6,22	*6,36*	*5,59*	*5,65*	*2,6*	*2,7*	3,5
980	10—50	5,30	*5,51*	*6,55*	3,54	3,21	3,04	1,28	*2,1*	2,4
	10—75	*7,51*	*6,99*	*8,20*	5,28	4,96	4,91	2,0	2,3	*4,2*
1060	10—50	3,56	3,84	5,15	2,11	2,02	2,25	1,2	1,1	*2,8*
	10—75	5,73	5,83	7,68	3,55	3,48	3,92	1,82	1,80	3,60
1140	10—50	2,15	2,14	3,28	1,25	1,21	2,27	0,88	0,65	2,4
	10—75	4,03	4,03	5,37	2,15	2,2	3,18	1,54	1,5	3,0
1220	10—50	1,31	1,28	2,23	0,73	0,96	2,01	0,99	0,54	2,6
	10—75	2,68	2,44	3,77	1,60	1,59	2,58	1,28	0,87	2,9

* Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Kick vom Agrikulturchemischen Institut der Universität Bonn bestens für die Überlassung dieser Probe.

Die Durchlaufmessung der Aktivität (siehe Abb. 3) kann natürlich auch in die automatische Ninhydrinfärbungs- und Meßkolonne nach Spackman, Stein u. Moore[42] oder nach Simmonds[41] zwischengeschaltet werden. Tab. 4 stellt noch einmal die verschiedenen experimentellen Ansätze zur radiochromatographischen Versuchsauswertung zusammen.

Tabelle 4. *Radiochromatographische Versuchsansätze*

Radiopapierchromatographische Ansätze	Radiogaschromatographische Ansätze	Radiosäulenchromatographische Ansätze
G.-M.-Zählrohr Fuller[12], Carleson[7] Warren[45]	*Proport.-Durchfl.-Zähler* Wolfgang, Rowland[52]	*G.-M.-Zählrohr* Dobbs[8]
Proport. Durchflußzähler Benson, Calvin[4] Winteringham[18,50,51] Roberts, Carleton[34]	*Scintillationszähler* Evans, Willard[11] Cordus, Willard[16] Herr, Schmidt, Stöcklin[21,22]	*Scintillationszähler* Menke[29] *Plastikscintillator* Schram, Lombaert[37]
Scintillationszähler Van der Does de Bye[44] Steenberg, Benson[43]	*Durchflußionisationskam.* Wilzbach, Riesz[49] Mason, Dutton[28] Dutton, Nystrom[10]	*Plastik-Scintillatorschl.* diese Arbeit
Flüssigk.-Scintil.-Messung Wilson[47] diese Arbeit	*Flüssigk.-Scintil.-Zähler* (niedrige Temperaturen) diese Arbeit	*Flüssigk.-Scintil.-Mess.* diese Arbeit
Zweidimensionale Messung Gilbert Keene[13], Aronoff[1], Winteringham[50] Packard[31]		

Nach Wolfgang u. Rowland[52] wird die Sensitivität der radiochromatographischen Messung durch die Gesamtimpulsrate N, welche von einem durchwandernden Gipfel erzielt wird und die durchschnittliche Impulsrate R, während der Peakpassage, begrenzt. Die anteilige Standardabweichung eines Ergebnisses entspricht demnach: $\sqrt{\frac{1}{N}\left(1+\frac{R_B}{R}\right)}$ (R_B = Nulleffekt).

Die Meßgenauigkeit bessert sich also mit ansteigender Gesamtimpulsrate N und durch Erhöhung der Durchschnittsimpulsrate R relativ zum Nulleffekt. Da das Volumen des Meßpräparats im Interesse einer guten Trennung niedrig bleiben sollte und meist nicht wesentlich erhöht werden kann, läßt sich vor allem bei Gas- und Säulenchromatographie durch die Kontrolle von Durchflußrate und Retentionsvolumen über die Temperatur auf die Höhe von N Einfluß gewinnen. Für maximale Sensitivität arbeitet man also zweckmäßig mit niedrigen Durchflußraten. Darüber hinaus wächst die Gesamtimpulsrate N bei gleichzeitiger Abnahme der

Standardabweichung direkt mit Erhöhung des aktiven Zählvolumens von Proportionalzählrohr, Durchflußionisationskammer oder Scintillationsspirale, was jedoch durch den schlechter werdenden Trenneffekt nur in bescheidenem Maße ausgenutzt werden kann.

Der bei Durchflußmessungen von radioaktiven Substanzen stets kritisch zu beobachtende „Memoryeffekt" ist bei den Glasspiralen, die zur Messung im ternären Flüssigkeitssystem dienten, wegen der hohen Verdünnung und Durchflußrate außerordentlich niedrig.

Aber auch bei den Spiralen und Spulen aus Plastik-Scintillatorschlauch wurde trotz der generell hohen Kontaminationsgefahr von Plastikoberflächen kein ausgeprägter „Memoryeffekt" beobachtet, wozu vermutlich die Beimischung einer grenzflächenaktiven Substanz zum Puffer des Eluats nicht unerheblich beitrug. Der stärkste Faktor zur Vermeidung merklicher „Memoryeffekte" ist natürlich die relativ hohe Ausbeute von 6—30%, die die Scintillator-Plastikschläuche und Glasspiralen im Koinzidenz-Scintillations-Spektrometer gewähren und damit auch für die schwachen β-Strahler das niederschwellige Arbeiten mit Bruchteilen eines Mikrocurie je Trennungsgang ermöglichen. Bei der Biosynthese markierter Substanzen sollte man, falls an säulenchromatographische Weiterverarbeitung gedacht ist, für ^{14}C und ^{35}S wenigstens eine spezifische Aktivität von 10 μc je Gramm Substanz anstreben.

Zusammenfassung

Die verschiedenen Ansätze der radiopapier-, -gas- und -säulenchromatographischen Verbundmethoden werden beschrieben.

Eigene experimentelle Beiträge erläutern besonders die Kombination dieser drei chromatographischen Verfahren mit der Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometrie.

Während die Messung eines Papierchromatogramms nach streifenweisem Zerschneiden und Eintauchen in Scintillatorlösung, oder die Aktivitätsmessung der in flüssigem Scintillator aufgefangenen gaschromatographischen Fraktionen, im Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer, in den Ausbeuten der Verwendung von Methandurchflußzähler oder Durchflußionisationskammer mindestens gleichwertig sind, ist bei der Radiosäulenchromatographie schwacher β-Strahler die Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometrie unzweifelhaft die Methode der Wahl.

Für ^{14}C- und ^{35}S-Proben verdient die Durchlaufmessung in einer Plastik-Scintillatorspirale den Vorzug, während Tritiumproben wegen des hier zu ungünstigen Oberflächen-Volumenverhältnisses nach vorheriger Mischung des Eluats 1:30 mit Toluol-Äthanol (2:1) + organischem Scintillator (0,3% DPO + 0,005% POPOP) beim Durchfließen einer Glasspirale zwischen den beiden Photomultipliern gemessen werden.

Der kontinuierliche Mischvorgang von Säuleneluat, Lösungs- und Verdünnungsmittel sowie die Aufzeichnung der Aktivitätskurve durch Verbindung des Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometers mit einem integrierenden Gerät und Kompensationsschreiber sind im einzelnen beschrieben.

Literatur

[1] Aronoff, F.: Nucleonics **14**, 6, 92 (1956). — [2] Baptista, A. M., A. G. J. Ramalko u. A. M. De Matos Pernandes: Int. J. appl. Rad. Isotopes **5**, 289 (1959). — [3] Baxter, R. A., u. R. T. Keen: Contract At-11-1-GEN-8 Atomics Int., Div. North American Aviation Inc., Canaga Park, Calif. — [4] Benson, A. A., J. A. Bassham, M. Calvin, T. C. Goodale, V. A. Haas u. W. Stepha: J. Amer. chem. Soc. **72**, 1710 (1950). — [5] Benson, A. A., B. Maruo, R. J. Flipse, H. W. Yurow u. W. W. Miller: U.N. Atom. Conf. Isotop. in Biochem. a. Physiol. **1**, (P/858) S. 289, Geneva 1958. — [6] Budzynski, A. Z., Z. J. Zubrzycki u. I. G. Campbell: U.N. Atom. Conf. Isotop. in Biochem. a. Physiol. **1**, (P/1588) S. 274, Geneva 1958). — [7] Carleson, G.: Acta chem. scand. **8**, 9, 1693 (1954). — [8] Dobbs, H. E.: J. Chromatogr. (Amsterdam) **2**, 572 (1959); vgl. diese Z. **175**, 37 (1960). — [9] Durrum, E. L., u. S. R. Gilford: Rev. Sci. Instruments **26**, 51 (1955). — [10] Dutton, H. J., E. P. Jones, L. A. Mason u. R. F. Nystrom: Chem. and Ind. **1958**, 1176. — [11] Evans, J. B., u. J. E. Willard: J. Amer. chem. Soc. **78**, 2908 (1956). — [12] Fuller, R. C.: Science (Lancaster, Pa.) **124**, 1253 (1956). — [13] Gilbert, G. W., u. J. P. Keene: Int. Conf. on Radioisotopes in Sci. Res. Unesco, RIC, 1, London, Pergamon Press, 1957. — [14] Glückauf, E.: Gas Chromatography of Highly Radioactive Gases. Gas Chromatography, N. Y., Academic Press, 1958. — [15] Glückauf, E.: Trans. Faraday Soc. **54**, 1203 (1958). — [16] Gordus, A., u. J. E. Willard: J. Amer. chem. Soc. **79**, 4609 (1957). — [17] Hais, J. M.: Československ. Farmac. **1**, 681 (1952). — [18] Harrison, A., u. F. P. W. Winteringham: Nucleonics **13**, 3, 64 (1955). — [19] Harrison, F. B.: Liquid Scint. Counting, Pergamon Press, 1958, S. 150. — [20] Hayes, F. N., R. P. Hiebert u. R. L. Schuch: Science (Lancaster, Pa.) **116**, 140 (1952). — [21] Herr, W., F. Schmidt u. G. Stöcklin: diese Z. **170**, 301 (1959). — [22] Herr, W., G. Stöcklin u. F. Schmidt: Z. Naturforsch. **146**, 11, 693 (1959). — [23] Hierbert, R. D., u. R. J. Watis: Nucleonics **11**, 12, 38 (1953). — [24] Kellershohn, C., u. P. Pellerin: Nucleonics **13**, 12, 34 (1957). — [25] Kuzin, A. M., u. V. J. Tokarskaya: Biochemistry (engl. Transl.) **24**, 71 (1959).— [26] Lovelock, J. E.: J. Chromatogr. (Amsterdam) **1**, 35 (1958); vgl. diese Z. **164**, 416 (1958). — [27] Mangold, H. K., B. G. Lamp u. H. Schlink: J. Amer. chem. Soc. **77**, 6070 (1955). — [28] Mason, L. H., H. J. Dutton u. L. R. Bair: J. Chromatogr. (Amsterdam) **2**, 322 (1959). — [29] Menke, K. H.: Habilitationsschrift, Landw. Fakultät, Bonn 1960. — [30] Moore, St., u. W. H. Stein: J. biol. Chemistry **192**, 663 (1951). — [31] Packard Instrument Company, La Gange, Ill. (USA). — [32] Price, T. D., u. P. B. Hudson: Analyt. Chemistry **26**, 1127 (1954). — [33] Post, R. F.: Nucleonics **10**, 6, 56 (1952). — [34] Roberts, H. R., u. F. J. Carleton: Analyt. Chemistry **28**, 11 (1956); vgl. diese Z. **153**, 315 (1956). —[35] Rossi, C.: 15th Int. Congr. of Pure and Applied Chem. Lisbon, Paper V—27, 1956. — [36] Scharpenseel, H. W.: Angew. Chem. **71**, 20, 640 (1959); vgl. diese Z. **175**, 62 (1960). — [37] Schram, E., u. R. Lombart: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **17**, 417 (1957); vgl. diese Z. **163**, 127 (1958). — [38] Scott, R. P. W. in: Vapour Phase Chromatography, ed. D. H. Desty and C. L. A. Harbourn, Butterworth, London 1957. — [39] Seliger, H. H.: Liquid Scintillation Counting, N. Y. Pergamon Press 115, 1958. — [40] Senyavin, M. M., G. M. Kolosawa u. V. A. Nikashina: Ž. neorg. Chim. **3**, 104 (1958). — [41] Simmonds, D. H.: Analyt. Chemistry **30**, 1034 (1958); vgl.

diese Z. **167**, 224 (1959). — [42] Spackman, D. H., W. H. Stein u. St. Moore: Analyt. Chemistry **30**, 1190 (1958); vgl. diese Z. **167**, 224 (1959). — [43] Steenberg, K., u. A. A. Benson: Nucleonics **14**, 12, 40 (1956). — [44] Van der Does de Bye, J. A. W.: Nucleonics **14**, 11, 128 (1956). — [45] Warren, G. W., u. R. W. Fink: J. inorg. nucl. Chem. **2**, 176 (1956). — [46] William, I. G. Mc., u. R. A. Dewar: Nature (London) **181**, 760 (1958); vgl. diese Z. **164**, 417 (1958). — [47] Wilson, A. T.: U. N. Atom. Conf. Isotop. in Biochem. a. Physiol. 2, Geneva 1958, S. 213. — [48] Wilzbach, K. E.: J. Amer. chem. Soc. **79**, 1013 (1957). — [49] Wilzbach, K. E., u. P. Piesz: Science (Lancaster, Pa.) **126**, 748 (1957). — [50] Winteringham, F. P. M.: Nature (London) **172**, 727 (1953). — [51] Winteringham, F. P. W., A. Harrison u. R. G. Bridges: Nucleonics **10**, 3, 52 (1952). — [52] Wolfang, R., u. F. S. Rowland: Analyt. Chemistry **30**, 903 (1958); vgl. diese Z. **166**, 129 (1959).

Dr. H. W. Scharpenseel, Institut für Bodenkunde der Universität, Bonn, Nußallee 1

Aus der Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co GmbH, Überlingen

Gaschromatographische Arbeitsmethoden

I. Die Anwendungsmöglichkeiten eines Flammenionisationsdetektors*

Von

D. Jentzsch und K. Friedrich

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Oktober 1960)

Das Anwendungsgebiet der gaschromatographischen Analyse hat sich in jüngster Zeit durch neue Säulen und neue Detektoren wesentlich erweitert. Die Trennwirkung von Säulen, die Nachweisgrenze der Detektoren und die Reproduzierbarkeit der Arbeitsweise konnten so verbessert werden, daß einerseits Vielkomponentengemische leicht aufgetrennt, andererseits Spurenanalysen mit sehr großen Konzentrationsunterschieden durchgeführt werden können.

Für diese Arbeiten ist ein „Ionisationsdetektor", besonders ein Flammenionisationsdetektor (FID), unerläßlich. Zusammen mit Capillarsäulen nach Golay oder in Verbindung mit den normalen Trennsäulen von etwa 6 mm ⌀, erlaubt er die oben erwähnten neuen Anwendungen. Dabei wird bereits im voraus darauf hingewiesen, daß der FID zwar neue Analysengebiete erschließen und dadurch die bisher bekannten Wärmeleitfähigkeitsdetektoren (WLD) ergänzen kann, sie aber keinesfalls ersetzen wird. Damit sind bereits die ersten Richtlinien für die apparative

* Erweiterter Text eines auf der Tagung der Fachgruppe „Analytische Chemie" innerhalb der Hauptversammlung der GDCh gehaltenen Vortrags, Stuttgart, 25. 4. 1960.

Ausrüstung eines modernen Gaschromatographen gegeben: Ein solches Instrument sollte ohne große Umbauarbeiten beide Arten von Detektoren zu benutzen gestatten.

Es werden im folgenden die Arbeitsmöglichkeiten mit einem FID bei besonderer Betonung der Spurenanalyse beschrieben.

Apparatur

Für die hier beschriebenen Messungen wurde das Fraktometer 116 E (Bodenseewerk-Perkin-Elmer & Co GmbH., Überlingen) verwendet, das mit einem WLD und einem FID ausgerüstet war. Eine Ansicht des mit zwei Schreibern ausgerüsteten Meßplatzes zeigt Abb. 1. Der 2,5 mV-Kompensograph (Fa. Siemens & Halske;

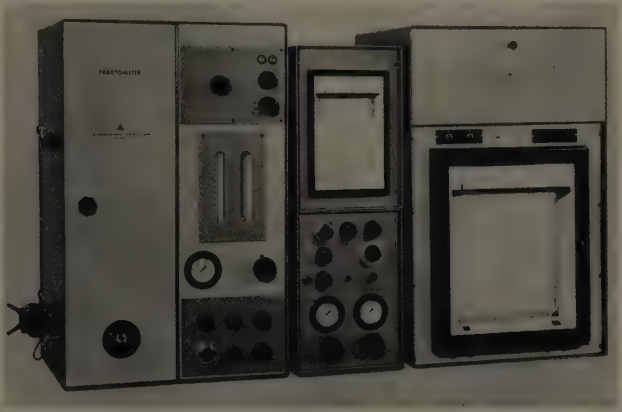

Abb. 1. Mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor und Flammenionisationsdetektor ausgerüstetes Fraktometer 116 E mit 2 Kompensographen zur gleichzeitigen Benutzung der beiden Detektoren

250 mm Schreibbreite, etwa 1,5 sec Einstellzeit für Vollausschlag) registriert die Signale des WLD, während der 2,5 mV-Kleinkompensograph (Fa. Siemens & Halske; 120 mm Schreibbreite, etwa 0,4 sec Einstellzeit für Vollausschlag) mit dem FID verbunden ist und sich auf Grund seiner kleinen Einstellzeit besonders für Fraktogramme von Golay-Säulen eignet. Der Zusatzschrank unter dem Kleinkompensographen enthält in Einschubbauweise den Verstärker für den FID und die Druckregelung für die beiden zusätzlich zum Trägergas benötigten Gase Wasserstoff und Luft.

Abb. 2 zeigt in einer Skizze, wie der FID auf den bekannten WLD aufgesetzt ist. Mit einem besonderen Zwischenstück (*4*) kann je nach Arbeitsweise vor oder nach der Trennsäule ein Bruchteil des Trägergases (und damit auch das Gemisch Trägergas und Substanz) abgezweigt werden, um entweder über eine Golay-Säule (*2*) oder direkt zum FID zu gelangen.

Abb. 3 zeigt hierzu ein Strömungsschema, aus dem die einzelnen Arbeitsmöglichkeiten unter Berücksichtigung von Tab. 1 zu entnehmen sind.

Zur Erläuterung sei ergänzend ausgeführt: Für das analytische, gaschromatographische Arbeiten gibt es heute zwei verschiedene Typen von

Trennsäulen, die normale Trennsäule (4—6 mm ⌀) und die Golay-Säule (0,1—0,2 mm ⌀). Beide unterscheiden sich u. a. durch ihre „Kapazität" gegenüber der Substanzaufgabe. Bei der ersten kann mit Probenmengen bis zu 40 μl, bei der letzten nur mit 10^2 bis 10^3 mal weniger gearbeitet werden. Dies bedeutet zunächst, daß zusammen mit Golay-Säulen nur ein Ionisationsdetektor und nicht ein WLD verwendet werden kann. Weiterhin ergibt sich, daß durch die geringe Probenmenge trotz der tieferen Nachweisgrenze eines FID keine Verbesserung der bisher bekannten Spurenanalyse auf Golay-Säulen möglich ist. Eine wesentliche Erweiterung der Spurenanalyse wird aber durch die Verwendung von einer normalen Trennsäule und einem FID erreicht, da die relativ hohe Kapazität der Säule mit der großen Empfindlichkeit des Detektors gepaart wird. Es ergeben sich so für die Kombination zwischen den beiden Säulenarten und den beiden Detektortypen folgende Möglichkeiten:

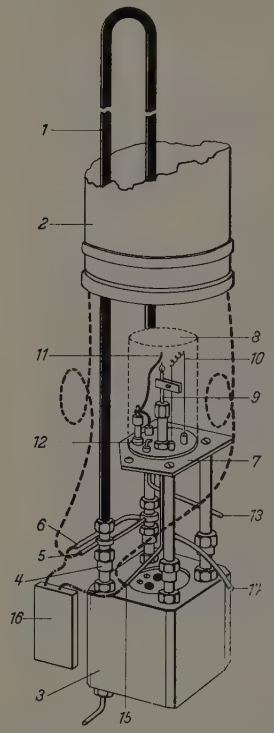

Abb. 2. Flammenionisationsdetektor auf Wärmeleitfähigkeitsdetektor zur Verwendung mit Capillarsäule nach Golay oder mit normaler Trennsäule. *1* Normalsäule 1 m; *2* Golay-(Capillar)-Säule; *3* Wärmeleitfähigkeitsdetektorblock; *4* Zwischenstück m. Anschlüssen für Strömungsteiler; *5* Anschluß für Golay-Säule; *6* Anschluß für Capillare 16; *7* FID; *8* Kappe; *9* Flammendüse; *10* Zünddraht; *11* Gegenelektrode; *12* Luftdüse; *13* Anschluß für Luftzuführung; *14* Anschluß für Wasserstoffzuführung; *15* Anschluß für Capillare 16, Trägergaszuführung aus Säule; *16* Capillare als Strömungswiderstand zwischen Säule und FID

1. Normale Trennsäule + WLD, geeignet für: qualitative und vor allem quantitative gaschromatographische Analysen im normalen Konzentrationsbereich. Substanzbedarf 1—10 μl. Linearitätsbereich des Detektors etwa $5 \cdot 10^2$.

2. Normale Trennsäule + FID, zu empfehlen für: Spurenanalysen, wobei es durch den großen Linearitätsbereich des FID von $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ gelingt, Haupt- und Spurenkomponente bei einer Substanzaufgabe quantitativ auszuwerten. Substanzbedarf $1 \cdot 10^{-2}$ bis 2 μl.

3. Normale Trennsäulen + WLD + FID zu benutzen bei:

a) Spurenanalysen, wenn alle Komponenten registriert werden sollen und dabei der Konzentrationsunterschied von etwa $1:10^8$ zwischen Haupt- und Spurenkomponente überschritten wird.

b) Analysen von Gemischen, die unter anderem Komponenten enthalten, die vom FID nicht angezeigt werden (inerte Gase, Wasser, Ammoniak und andere siehe unten).

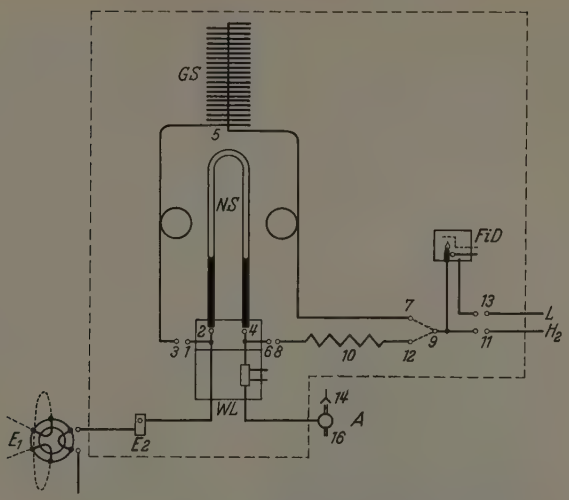

Abb. 3. Strömungsschema für die verschiedenen Arbeitsmöglichkeiten. Erläuterungen siehe Tab.1

Tabelle 1. *Strömungsverlauf bei den Arbeitsmöglichkeiten im Fraktometer mit WLD nach Einbau eines FID mit Zwischenstück*

1. Normalsäule mit WLD

E_1 oder E_2 — (1 geschlossen) — 2 — NS — 4 — (6 geschlossen) — WLD — 16

2. Normalsäule + FID

E_1 oder E_2 — (1 geschl.) — 2 — NS — 4 — (A geschl.) — 6 — 8 — 10 — 12 — 9 — FID
Die gesamte Strömung gelangt in den FID! Nicht immer zu empfehlen. Wenn Teilung, dann nach NS bei 6, siehe hierzu 3.

3. Normalsäule + WLD und FID

E_1 oder E_2 — (1 geschlossen) — 2 — NS — 4 — WLD — 14
4 — 6 — 8 — 10 — 12 — 9 — FID

Die Kanüle 14 und die Capillare 10 werden so gewählt, daß die gewünschte Strömungsteilung nach der NS für die beiden Detektoren zustande kommt. (Zum Beispiel WLD : FID = 1:1, 3:1, 10:1 usw.)

4. Golay-Säule + FID u. Normalsäule (1 m) mit oder ohne WLD

E_1 oder E_2 — 2 — *NS* — 4 — (6 geschlossen) — WLD — 14 oder 16
1 — 3 — *GS* — 7 — 9 — FID

Die NS dient in erster Linie als Strömungswiderstand des Strömungsteilers 1, um die notwendige kleine Substanzmenge auf die Golaysäule aufzubringen.

Hierin bedeuten: A Ausgangshahn (links außen am Fraktometer); E_1 Gasproben einlaßteil; E_2 Einspritzblock; FID Flammenionisationsdetektor; GS Golay-(Capillar)-Säule; NS Normale Trennsäule; WLD Wärmeleitfähigkeitsdetektor.

4. Golay-Säule + FID, anzuwenden bei: Auftrennung von Vielkomponentengemischen, Isomerengemischen und Gemischen weiten Siedebereichs.

5. Golay-Säule + normale Trennsäule + FID + WLD vorzuschlagen für:

a) den Nachweis von Komponenten, die von dem FID nicht angezeigt werden.

b) den Vergleich von Trennleistungen der beiden Säulentypen.

c) „Gruppenanalysen"; die quantitative Analyse wird mit dem WLD durchgeführt, das Golay-Chromatogramm dient zur Kontrolle der „Reinheit" der einzelnen Peaks.

Flammenionisationsdetektor

Bezüglich des allgemeinen Aufbaues und der Wirkungsweise kann auf die Literatur verwiesen werden. Die hier verwendete Konstruktion erzeugt zwischen der elektrisch isolierten Düse und einer Platin-Iridium-

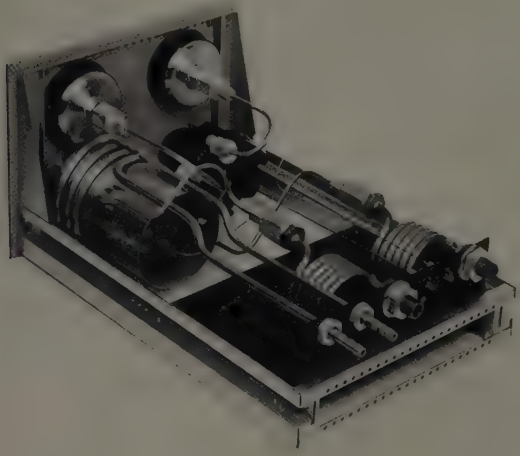

Abb. 4. Druckregeleinschub zum Einstellen der notwendigen Wasserstoff- und Luftströmung und zur Reinigung der benutzten Gase

Gegenelektrode das elektrische Feld durch Anlegen einer Spannung von 135 V. Eine kleine Platinspirale erlaubt die Wasserstoffflamme von außen zu zünden. Der Wasserstoff wird dem Trägergas nach der Säule zugemischt, die Luft wird direkt in die Brennkammer geleitet. Die Regulierung der beiden, zusätzlich notwendigen Gase erfolgt an einem besonderen, in Abb. 4 gezeigten Einschub. Für die Reinigung der Gase sind Aktivkohle- und Glaswollefilter vorgesehen. Besonderes Augenmerk ist der Thermostatisierung des Wasserstoff-Druckfeinreglers gewidmet. Ein Kupfermantel mit Rohrspirale erlaubt zu diesem Zweck den Anschluß eines Flüssigkeitsthermostaten.

Die Größe des von einem FID gegebenen Signals hängt von zahlreichen Parametern ab, die des besseren Verständnisses wegen kurz aufgeführt werden.

Für den *Elektrodenabstand* gibt es eine optimale Größe, die u. a. von der *Düsenform* abhängig ist. Zu großer Abstand läßt das Signal ebenso absinken wie ein zu kleiner, bei dem die Gegenelektrode eine Abkühlung der Flamme verursacht. Während diese beiden Parameter meist durch die gewählte Konstruktion gegeben sind, liegt die Wahl der folgenden in der Hand des Benutzers.

Die Abb. 5 zeigt in schematischer Form, daß die optimale *Wasserstoffmenge* bei etwa 1—1,2 l/Std liegt, der Kurvenzug ist steil. Demgegenüber ist die Einstellung der *Luftströmung* (vgl. Abb. 6) nicht so kritisch, 20—25 l/Std sind ausreichend. Als Ionisationsdetektor spricht der FID nicht wie ein WLD auf Substanzkonzentration im Trägergas (mg/ml) an, sondern

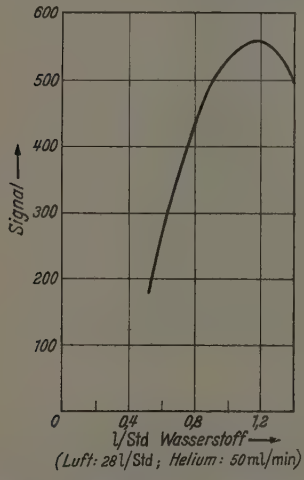

Abb. 5. Prinzipbild über die Abhängigkeit der Signalgröße von der Wasserstoffströmung

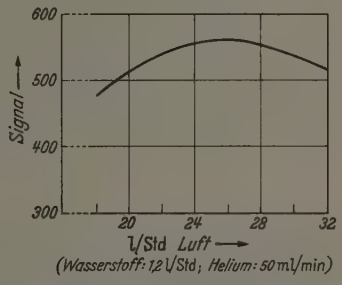

Abb. 6. Prinzipbild über die Abhängigkeit der Signalgröße von der Luftströmung

ist proportional der je Zeiteinheit in die Flamme gelangenden Substanzmenge (mg/sec). Die Signalgröße ist also der Trägergasgeschwindigkeit direkt proportional. Bei der Auswahl des Trägergases entfallen zunächst die beim WLD bekannten Regeln der Wärmeleitfähigkeit: Statt Helium können Stickstoff, Argon oder andere wohlfeile reine Gase benutzt werden. Nach bekannten theoretischen Beziehungen verstärken höhermolekulare Trägergase die Trennleistung der Säule. Wird Wasserstoff als Trägergas verwendet, verzichtet man auf die unabhängige Einstellung des Träger- und Brenngases. Die Anwendung des Meßplatzes wird dadurch eingeschränkt, da für die optimale Trennleistung einer Säule nur eine bestimmte Trägergasströmung zulässig ist. Bei normalen Säulen

(etwa 6 mm ⌀) empfiehlt es sich, den Bereich von 50—100 ml/min zu benutzen. Das für alle Messungen allein wichtige Verhältnis von Signal zu Störpegel ist ebenfalls nicht unabhängig von der Trägergasgeschwindigkeit. Wann für den Quotienten ein Optimum vorliegt, ist abhängig von den Arbeitsbedingungen (Säulenart, Arbeitstemperatur) und kann nicht allgemein formuliert werden.

Weitere Vergleiche zwischen den beiden Detektortypen zeigen, daß ein FID den zu messenden Substanzen gegenüber „spezifischer" ist als ein WLD. Dies ist an sich für analytische Methoden im Prinzip kein Nachteil, wenn die Gesetzmäßigkeiten dafür bekannt sind. Gerade dies gilt heute für den FID noch nicht. Während bei quantitativen Analysen einer Substanzmischung aus homologen Verbindungen (z. B. n-Paraffinen) mit einem WLD die Flächenprozente des Fraktogrammes gut in erster Näherung gleich den Gewichtsprozenten gesetzt werden können, sind selbst für so ähnliche Verbindungen bei Messungen mit einem FID substanzspezifische Faktoren zu berücksichtigen.

In erster Näherung ist die Empfindlichkeit eines FID der C-Zahl einer Verbindung proportional. Dies gilt streng innerhalb homologer Reihen. Mit zunehmender Substitution der Wasserstoffatome durch andere Atome oder Atomgruppen (Halogene, Oxy- oder Amino-Gruppen) nimmt — nach bisher vorliegenden Daten — die Empfindlichkeit ab. Bei Verbindungen gleicher C-Zahl scheint die Empfindlichkeit für den n-Kohlenwasserstoff immer am höchsten zu sein. Verbindungen, die keinen Kohlenstoff enthalten, sind mit einem FID nicht direkt nachzuweisen. Tab. 2 gibt hierzu eine Zusammenstellung.

Tabelle 2. *Elemente und Verbindungen, die der FID nicht direkt anzeigt*

Wasserstoff	Ammoniak	Kohlenmonoxyd
Sauerstoff	Distickstoffmonoxyd	Kohlendioxyd
Stickstoff	Stickstoffmonoxyd	Kohlenoxysulfid
	Stickstoffdioxyd	Schwefelkohlenstoff
Helium		
Neon	Trichlorsilan	Schwefelwasserstoff
Argon	Siliciumtetrachlorid	Schwefeldioxyd
Krypton	Siliciumtetrafluorid	Wasser

Voraussetzung für eine quantitative Analyse ist die Linearität des Anzeigesystems, das im allgemeinen aus einem Detektor, Verstärker und Schreiber besteht. Bei den bisher verwendeten WLD-Konstruktionen war der Linearitätsbereich durch den Detektor selbst begrenzt, der größere Substanzmengen nur unter Abweichung von der Linearität anzeigte. In diesem Zusammenhang war zur Signalreduzierung nur ein Spannungsteiler von $5 \cdot 10^2$ sinnvoll. Der FID hat nun als erster in der Gaschromatographie verwendeter Detektor einen wesentlich größeren

Linearitätsbereich, der — wie aus Abb. 7 hervorgeht — 5—6 Zehnerpotenzen umfaßt. Das Diagramm zeigt die durch den FID gemessene Menge Benzol (mg) als Funktion der absolut gemessenen Fläche (mV · min). Die zahlreichen Meßpunkte zeigen nur statistische Abweichungen von der Geraden.

Es wurde folgendermaßen gearbeitet: Mit Hilfe einer 10 μl Hamiltonspritze wurde stets 1 μl Flüssigkeit aufgegeben. Durch einen Strömungsteiler nach der normalen Trennsäule (2 m Q, stationäre Phase Apiezonfett) gelangte davon nur der vierte Teil zum FID. Mit großem Papiervorschub (40 bzw. 80 mm/min) wurde der

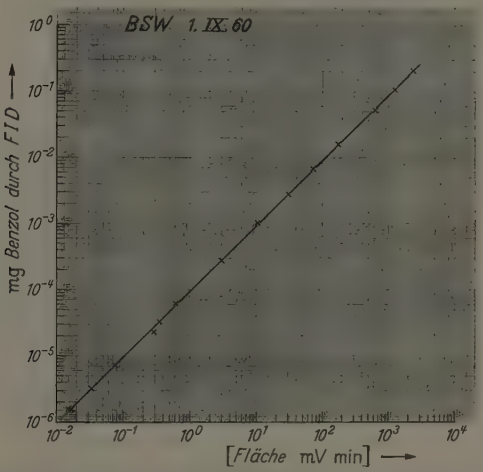

Abb. 7. Linearitätsbereich eines Flammenionisationsdetektors. In den Detektor gelangende Menge Benzol (mg) als Funktion der gemessenen Peakfläche (mV · min) Arbeitsbedingungen: Säule 2 m Q, 110° C, 20 ml/min Helium durch den FID

Benzolpeak registriert und dann die Fläche aus Höhe mal Halbwertsbreite (mV · min) errechnet. Die notwendigen kleineren Benzolmengen wurden nach Verdünnen mit Toluol oder m-Xylol aufgegeben. Letzteres mußte wegen des relativ hohen Benzolgehaltes des Toluols gewählt werden. Korrekturen durch den Blindwert wurden immer dann vorgenommen, wenn dieser mehr als 1% des eingewogenen Benzolgehaltes betrug. Die eingetragenen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 3 Messungen. Bei den höheren Verdünnungen wurden zwei verschieden eingewogene Lösungen untersucht. Die Abweichungen vom Mittelwert betrugen im allgemeinen weniger als 2% (relativ), nur bei höheren Konzentrationen traten Abweichungen von etwa 5% (relativ) auf. Die ohne Normierung, also mit absoluter Auswertung ausgeführte Meßreihe zeigte die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit des FID.

Die elektrischen Eigenschaften des FID stellen besondere Anforderungen an den benutzten Verstärker, dessen Aufbau aus Abb. 8 zu ersehen ist. Infolge der niedrigen Nachweisgrenze müssen noch Ionenströme von etwa 10^{-12} A gemessen werden. Da sich eine direkte Kopplung des Detektors mit dem Schreiber wegen des begrenzten Innenwiderstandes des letzteren verbietet, muß ein rückwirkungsfreies Zwischenglied verwendet werden. Ein solcher „Verstärker" — man spricht besser von

„Impedanzwandler" — besitzt einen hochohmigen, an die Flamme angepaßten Eingangswiderstand (etwa $3 \cdot 10^9\,\Omega$) und einen niederohmigen dem Kompensographen angepaßten Ausgangswiderstand. Die bisher übliche Anordnung, einen Spannungsteiler zum Wechsel des Meßbereiches an den Ausgang des Verstärkers zu legen, ist auch hier möglich. Allerdings gelingt dies nur mit einem Bereich von $1:2{,}5 \cdot 10^2$ (9 Stufen mit Faktor 2). Um den ganzen Linearitätsbereich eines FID

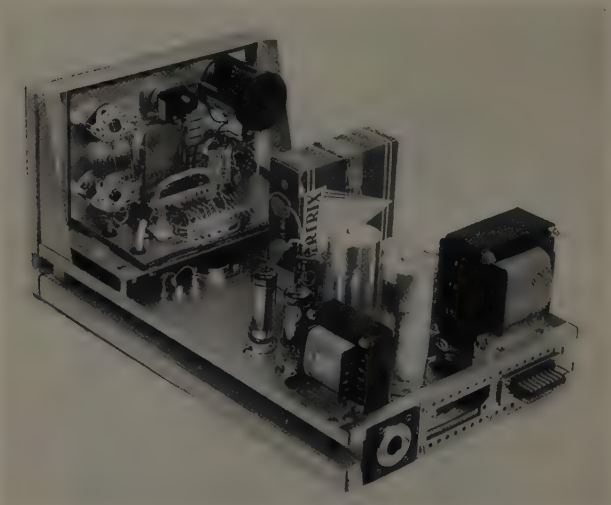

Abb. 8. Elektronikeinschub zum Flammenionisationsdetektor

ausnutzen zu können, wird der Bereich noch einmal um den Faktor 10^2 durch Umschalten des Eingangswiderstandes von $3 \cdot 10^9\,\Omega$ auf $3 \cdot 10^7\,\Omega$ erweitert. Damit kann das Signal maximal um den Faktor $2{,}56 \cdot 10^4$ abgeschwächt werden.

Der Kompensograph selbst gestattet zusätzlich durch verschieden hohe Ausschläge ein Signalverhältnis von $1:10^2$ auszunutzen. Mit Hilfe von zwei Potentiometern kann für beide Eingangswiderstände des Verstärkers eine Nullstromkompensation erreicht werden, so daß ohne Mühe der Eingangswiderstand des Verstärkers auch während einer Analyse umgeschaltet werden kann.

Anwendungsbeispiele und Arbeitserfahrungen

Die Abb. 9—15 zeigen Beispiele für die Anwendung eines FID in Verbindung mit normalen Trennsäulen zur Spurenanalyse. Es wurden zunächst Kohlenwasserstoffe untersucht, die — wie z. B. das n-Pentan — besonders für die Gaschromatographie empfohlen waren oder die — wie z. B. das n-Hexan — als Lösungsmittel in der UV-Spektroskopie Verwendung fanden. In den einzelnen Fraktogrammen sind auf kleinen Pfeilen die Umschaltungen des Meßbereichs (der Empfindlichkeit) und der Faktor angegeben, mit dem die einzelnen Flächen zur Normierung auf höchste Empfindlichkeit zu multiplizieren sind.

Prinzipiell kann man zwei Methoden der Spurenanalyse mit einem FID unterscheiden:

1. Die Aufgabemenge wird so gewählt, daß neben den Spuren auch noch die Menge der Hauptkomponente in den Linearitätsbereich des Detektors fällt. Dann sind aus einer Probenaufgabe in einem Fraktogramm alle Komponenten quantitativ auswertbar. Bei C_5-C_6-Kohlenwasserstoffen können so bei einem Strömungsteiler

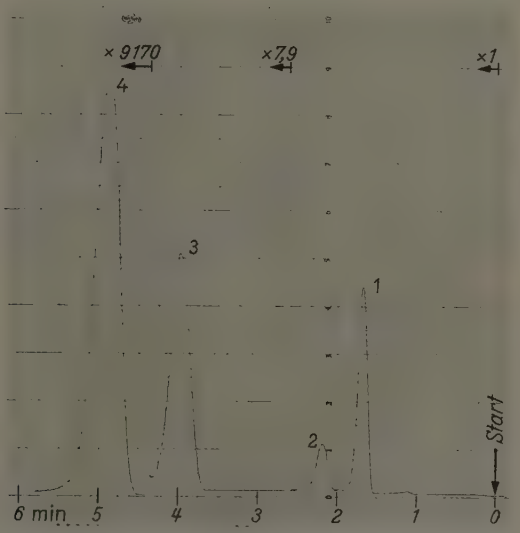

Abb. 9. 2 µl n-Pentan. Säule C 2 m, 42°C, Strömungsteiler 1 (FID): 0.8. Peak *1)* ~ 20 ppm; *2)* ~ 5 ppm; *3)* iso-Pentan ~ 370 ppm; *4)* n-Pentan

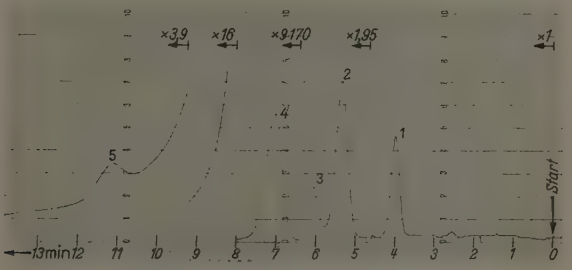

Abb. 10. 1 µl Cyclohexan. Säule Q 2 m, 91° C, Strömungsteiler 1 (FID): 0,9. Peak *1)* ~ 45 ppm; *2)* ~ 190 ppm; *4)* Cyclohexan; *5)* ~ 140 ppm

nach der Säule von etwa 1:1 noch 2 µl Flüssigkeit aufgegeben werden, falls mit üblichen Trägergasgeschwindigkeiten (50—100 ml/min) gearbeitet wird und die Arbeitstemperatur nicht wesentlich über der Siedetemperatur der Hauptkomponente liegt. Die untere Nachweisgrenze liegt dabei zwischen 0,1 und 1 ppm. Die Bedeutung dieser Arbeitsweise ist in der quantitativen Erfassung *aller* Komponenten der aufgegebenen Substanz zu sehen.

2. Verzichtet man auf die Auswertung der Hauptkomponente, so kann durch Analysieren der 10—20fachen Substanzmenge die Nachweisgrenze um dieses Viel-

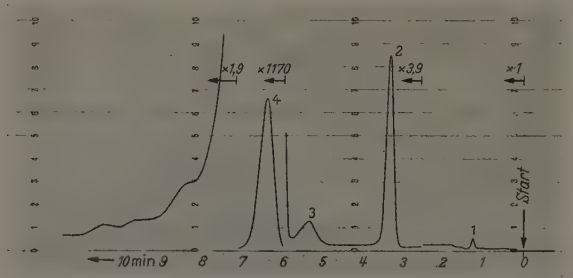

Abb. 11. 1 µl Toluol. Säule Q 2 m, 105° C, Strömungsteiler 1 (FID): 6,9. Peak *1)* ~12 ppm; *2)* Benzol ~ 2170 ppm; *3)* ~ 625 ppm

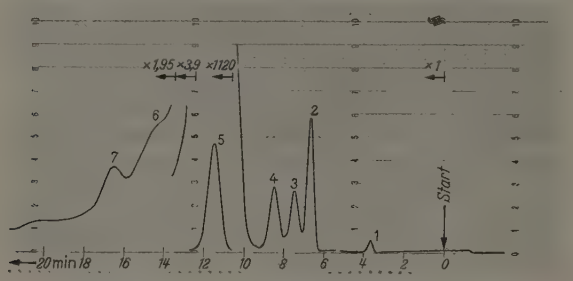

Abb. 12. 1 µl Äthylbenzol. Säule Q 2 m, 105° C, Strömungsteiler 1 (FID): 6,9. Peak *1)* Benzol ~ 34 ppm; *2)* Toluol ~ 600 ppm; *3)* ~ 355 ppm; *4)* ~ 425 ppm; *5)* Äthylbenzol; *7)* ~ 560 ppm

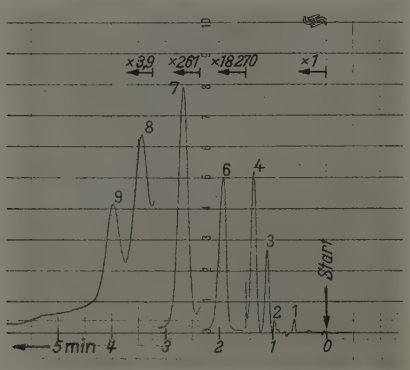

Abb. 13. 2 µl n-Hexan. Säule Q 2 m, 91° C, Strömungsteiler 1 (FID): 6,9. Peak *1)* ~ 1,5 ppm; *2)* ~1.5 ppm; *3)* ~15 ppm; *4)* ~40 ppm; *6)* n-Hexan; *7)* ~2900 ppm; *8)* ~190 ppm; *9)* ~180 ppm

fache gesenkt werden, d. h. also bis zu etwa 0,01 ppm = 10 ppb. Der Peak der Hauptkomponente wird nicht mit erfaßt, in manchen Fällen erlischt sogar bei ihm die Flamme und muß neu gezündet werden. Abb. 14 zeigt hierfür ein Beispiel. Es

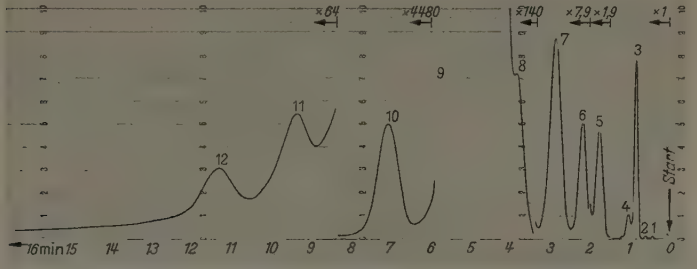

Abb. 14. 40 μl n-Hexan. Säule Q 2 m 56° C, Strömungsteiler 1 (FID): 0,9. Peak *1)* und *2)* in der Größenordnung von 0,01 ppm ≙ 10 ppb; *3)* ~ 1.3 ppm entspricht *1)* in Abb. 13; *5)* ~ 3 ppm, entspricht *2)* in Abb. 13; *6)* wurde als Bezugspeak genommen, aus der Analyse von Abb. 13 wurde das Verhältnis der Peaks *9)* zu *6)* errechnet, so daß sich in dieser Analyse die oben angegebenen Zahlen ergaben. Bei so großer Probenmenge ist die Hauptkomponente nicht mehr zu registrieren

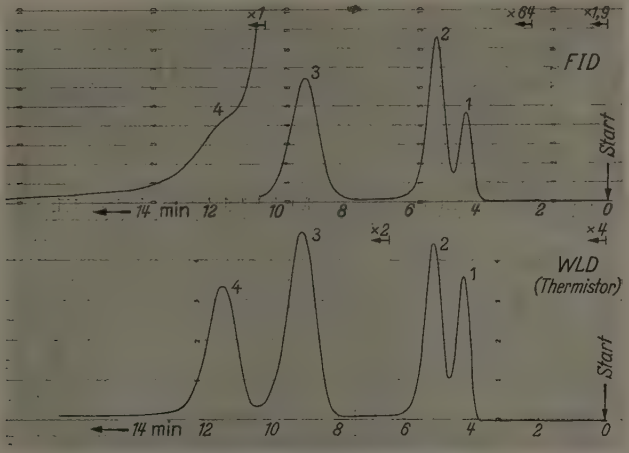

Abb. 15. Analyse einer Mischung aus Methanol (*1*), Äthanol (*2*), Propanol (*3*) und Wasser (*4*). Oberes Fraktogramm mit FID, unteres mit WLD registriert. Säule W 2 m, 91° C. Teiler 1:7. 0,2 μl Probe

wurde die in Abb. 13 gezeigte Analyse mit 40 μlHexan wiederholt. Peak *3)* entspricht etwa 1,3 ppm von Hexan und liefert 80% des Vollausschlages auf dem Schreiber. Die Peaks *1)* und *2)* entsprechen etwa 10 ppb.

Es wurde in allen Fällen die Fläche des Peaks aus Höhe und Halbwertsbreite berechnet. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf die Hauptkomponente. Die vollständige Identifizierung der einzelnen Spuren dürfte nur mit genauer Kenntnis des Herstellungsprozesses der einzelnen Kohlenwasserstoffe in annehm-

barer Zeit möglich sein. Durch die apparative Anordnung, die eine Verwendung von Strömungsteilern zuläßt, ist auch die Kontrolle präparativer Arbeiten mit einem FID möglich. Auf die Anwendung von substanzspezifischen Faktoren, die die spezifische Empfindlichkeit des FID berücksichtigen, wurde verzichtet, da die Größenordnung der errechneten Flächenverhältnisse auch dann erhalten bliebe und eine sichere Zuordnung der Peaks nicht in allen Fällen möglich war.

Abb. 15 zeigt ein Beispiel für die Benutzung eines WLD neben einem FID. Die Abbildung zeigt die Aufnahme einer Testmischung aus Methanol, Äthanol, Propanol und Wasser. Der obere Teil gibt das mit dem FID gewonnene Fraktogramm wieder, der untere Abschnitt ist die Aufnahme des Thermistordetektors. Für die Wasserbestimmung muß ein WLD verwendet werden, da ein FID Wasser nicht direkt nachweisen kann. Der Wasserpeak (*4*) erscheint nur als Schulter auf dem Auslauf des Propanolpeaks (*3*). Diese Tatsache beweist einerseits, daß die Flamme — durch Strömungs- oder Temperaturänderungen — Verbindungen, die in Tab. 2 aufgeführt sind, indirekt anzeigen kann, wenn diese in größerer Menge vorliegen. Andererseits eröffnet sich gerade durch die ziemlich geringe Empfindlichkeit des FID gegenüber Wasser ein neues Anwendungsgebiet, da besonders in Verbindung mit der Säule *W* (Polyäthylenglykol auf Teflonpulver) eine Untersuchung von Wasser auf organische Beimengungen oder Spuren (z. B. bei Abwässern) leicht durchführbar ist.

Voraussetzung für die Ausführung von Spurenanalysen mit einem FID ist besonders sorgfältiges und sauberes Arbeiten. Die benutzten Trennsäulen müssen mehrere Stunden 50—100° C über der Arbeitstemperatur bei hoher Trägergasgeschwindigkeit ausgeheizt werden. Dabei darf die maximal zulässige Temperatur für die Säule nicht überschritten werden. Die Flüchtigkeit mancher stationärer Phasen schränkt auch dann noch die Verwendbarkeit zusammen mit einem FID ein. Am besten haben sich Säulen, die mit Siliconöl (Säule *C* und *O*), Apiezonfett (Säule *Q*), Polypropylenglykol (Säule *R*) beschickt sind, bewährt. Andere — wie z. B. die Säule *A* (n-Decylphthalat) oder *K* (Polyäthylenglykol) — sollten nur höchstens 50—80° C unter der bisher als maximal zulässig angegebenen Temperatur benutzt werden.

Besonderes Augenmerk ist der Reinheit der verwendeten Gase zu widmen. Als Verbrennungsluft wird „synthetische Luft", die aus flüssigem Sauerstoff und Stickstoff gemischt wird (Fa. Linde, Nürnberg) wegen ihrer extremen Ölfreiheit empfohlen. Nachgereinigter Stickstoff, Argon oder Helium sind als Trägergase anwendbar. Der nachgereinigte Wasserstoff wird — wie bereits oben beschrieben — im Druckregeleinschub nochmals über eine Aktivkohlesäule gereinigt. Ein regelmäßiges Ausheizen dieser Säule verringert den Störpegel des FID.

Bei Berücksichtigung dieser Erfahrungen gelingt es auch bei höchster Empfindlichkeit des Detektors den Störpegel $\leq \pm 1\%$ des Vollausschlages eines 2,5 mV-Schreibers zu halten. Dieser Störpegel entspricht bei der verwendeten Apparatur $\pm 1{,}5 \cdot 10^{-13}$ Amp.

Zusammenfassung

Es wurden in der vorliegenden Arbeit die Arbeitsmöglichkeiten mit einem FID beschrieben. Dabei sollte vor allem hervorgehoben werden, daß neben der Kombination dieses Detektors mit einer Capillarsäule nach GOLAY eine wesentliche Erweiterung der bisher üblichen gaschromatographischen Spurenanalyse bei Verwendung von normalen Trennsäulen möglich ist. Bei Kohlenwasserstoffen können unter Benützung des großen Linearitätsbereiches eines FID noch Konzentrationsunterschiede von $1:10^6$ quantitativ gemessen werden. Bei Verzicht auf die Registrierung

der Hauptkomponente können mit 20—40 μl Probe noch Verunreinigungen in der Größenordnung von 10 ppb ($1 \cdot 10^{-9}$) nachgewiesen werden. Bei sorgfältigem Arbeiten und Verwendung von reinen Gasen ist auch bei höchster Empfindlichkeit der Störpegel $\leq \pm 1{,}5 \cdot 10^{-13}$ Amp. Die Auswertung der als Beispiele aufgeführten Fraktogramme ergibt, daß z. B. ohne Mühe noch $5 \cdot 10^{-12}$ g n-Pentan je Milliliter Trägergas mit einem FID nachzuweisen sind.

Wir wollen unseren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre gewissenhafte Arbeit und zahlreichen Kollegen für wertvolle Anregungen und Hinweise herzlich danken.

Literatur

Condon, R. D., P. R. Scholly u. W. Averill: Votrag auf dem III. Int. Symposium über Gaschromatographie, Edinburgh, 1960. — Desty, D. H., C. J. Geach u. A. Goldup: Vortrag auf dem III. Int. Symposium über Gaschromatographie, Edinburgh, 1960. — McWilliam, J. G., u. R. A. Dewar: Gaschromatography, Butterworths Sci. Publ. London, 1958, S. 174. — Ongkiehong, L.: Diss. Techn. Hochsch. Eindhoven, 1960. — Thompson, A. E.: J. Chromatogr. (Amsterdam) 2, 148 (1959).

Dr. D. Jentzsch, Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen/See

---

Detection of Arsenic, Antimony and Tin in Forensic Toxicology by Paper Chromatography

By

Swarup Narain Tewari

(Received November 30, 1960)

The present paper deals with the application of paper chromatographic[1–4] technique for the detection of arsenic, antimony and tin in the viscera, vomit, stomach wash, skin, hair and nails and other miscellaneous exhibits received for the examination in the toxicological laboratory.

30—40 g of liver (20—30 g of bones) are cut into small pieces and dried by keeping on a water bath. To this is added 10 ml of strong sulphuric acid and 50 ml of strong nitric acid to cover up the mass. The whole mass is heated on flame to make a slurry. This is then transferred to a silica Kjeldahl flask, heated on a flame till it carbonises. Add drop by drop concentrated nitric acid till it becomes a clear solution. Cool and add ammonium oxalate saturated solution in excess so as to drive away all the nitrous fumes. Filter and make to a desired volume. This solution after reduction with SO_2 water and pyrogallol can be subjected to Marsh test for the detection of arsenic and antimony.

The filtrate is evaporated to remove acid, diluted to a known volume (1 to 5 ml) and an aliquot (0.01 to 0.02 ml) of the well mixed solution is taken for spotting the chromatogram. Whatman No. 1 paper was used and the chromatogram was

developed by the ascending technique. The solvent used was a mixture of n-butanol-3N hydrochloric acid (upper layer). After the development for 6 hours the chromatogram was dried at room temperature and sprayed with 0.5% solution of dithizone in chloroform.

The arsenic forms a yellow band, R_f 0.83; antimony an orange, R_f 0.34 and tin a deep pink, R_f 0.99. The sensitivity of detection was 2.0 μg by this technique. This method is less cumbersome and easier to perform than the Marsh procedure which requires an expert hand to perform the routine tests in a toxicological laboratory.

Summary

A paper chromatographic technique for the detection of arsenic, antimony and tin as applied to toxicological analysis has been described.

References

[1] LEDERER, M.: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **4**, 629 (1950); cf. Z. analyt. Chem. **136**, 284 (1952). — [2] MARTIN, E. C.: Anal. chim. Acta (Amsterdam) **5**, 511 (1951); cf. Z. analyt. Chem. **137**, 40 (1952/53). — [3] TEWARI, S. N.: Naturwissenschaften **41**, 229 (1954); cf. Z. analyt. Chem. **145**, 287 (1955). — [4] TRIPATHI, D. N., and S. N. TEWARI: J. prakt. Chem. **9**, 1 (1959). — Z. analyt. Chem. **172**, 161 (1960).

Dr. S. N. TEWARI, 18/3A, The Mall, Kanpur (India)

Government Metallurgical Laboratory, University of the Witwatersrand, Milner Park, Johannesburg (South Africa)

Colorimetry of Sulphur Anions

Part III*

Determination and Evaluation of Polythionates above Trithionate

By

P. J. URBAN

(Received December 5, 1960)

Based on the reaction:

$$S_4O_6^{2-} + CN^- + 2OH^- = SCN^- + S_2O_3^{2-} + SO_4^{2-} + H_2O,$$

first ROBINSON [4] and subsequently NIETZEL and DE SESA [2] developed an excellent method for the spectrophotometric determination of tetrathionate. As NIETZEL and DE SESA pointed out, penta- and hexathionate undergo similar reactions, and each will interfere in the determination of the other. It has been the experience of the present author [8], together with SCHMIDT [6] and WEITZ et al. [11], that polythionates generally occur as a mixture containing tetrathionate and various amounts of up to

* Part II.: URBAN, P. J.: Z. analyt. Chem. **179**, 422 (1961).

about five higher polythionates in an equilibrium. Indeed SCHMIDT considers that these polythionates undergo disproportionation reactions of the type:

$$2S_5O_6^{2-} \rightleftharpoons S_4O_6^{2-} + S_6O_6^{2-},$$

and that any single polythionate in solution will form an equilibrium mixture containing many other polythionates[5].

The present method which determines n, the mean number of sulphur atoms in the formula $S_nO_6^{2-}$ for polythionates above trithionate, as well as the molar concentration of these polythionates, gives a more accurate indication of the polythionate composition of the solution.

When one molecule of any polythionate, $S_nO_6^{2-}$, (above trithionate) undergoes cyanolysis, $(n-3)$ molecules of thiocyanate and one molecule of thiosulphate are among the products formed; these facts have been utilized in developing this method for n. Use has been made again of SÖRBO's finding[7] that cupric chloride catalyses the cyanolysis of thiosulphate. The reagents and procedure employed are very similar to those in paper I of this series, viz., for the determination of thiosulphate[9].

Under alkaline conditions, polythionates react with cyanide as follows:

$$S_nO_6^{2-} + (n-3)\,CN^- + 2\,OH^- = S_2O_3^{2-} + (n-3)\,SCN^- + SO_4^{2-} + H_2O \ldots (A).$$

If cupric chloride catalyst is added after this reaction, the thiosulphate formed is converted to some further thiocyanate. The overall reaction is then:

$$S_nO_6^{2-} + (n-2)\,CN^- + 2\,OH^- = SO_3^{2-} + (n-2)\,SCN^- + SO_4^{2-} + H_2O \ldots (B).$$

The value of n in the formula $S_nO_6^{2-}$ can be calculated after determining the different amounts of thiocyanate formed in reactions (A) and (B).

Suppose A mg SCN^- are formed in reaction (A), and B mg in reaction (B), then $\frac{A}{B} = \frac{(n-3)}{(n-2)}$. Rearranging: $n = \frac{3B-2A}{B-A}$ or $n = \frac{A}{B-A} + 3$.

The second of these two equations for determining n is simpler and quicker to use. From this equation it can be seen that if the experimental value of A is too high or too low, then the value of n will also be too high or too low respectively; the reverse holds true for the value of B. If a polythionate is incompletely cyanolysed, the value of n determined by this method will not be affected; this is based on the experimental fact that the addition of cupric chloride stops the cyanolysis of polythionates and catalyses that of thiosulphate. If alkaline hydrolysis of polythionate occurs as a side-reaction during neutralization or cyanolysis, too little thiocyanate and too much thiosulphate will be formed; thus A

will be too low and B too high, both of which will cause n to be too low. Free thiosulphate would cause the results for n to be too low; when present it should be determined[9], and the value of B corrected. The presence of trithionate would cause both the values of A and B to be somewhat too high; once it has been determined[10], the values of A and B should be corrected.

Experiments used to determine the value of n colorimetrically in aqueous polythionate solutions are described below. The results have been compared with those obtained by iodimetric methods, such as are described by the present author[8], and good agreement was obtained. These colorimetric methods are preferred to the iodimetric methods for application to dilute solutions, as the necessity of working with standard millinormal iodine solutions is avoided.

Experimental

Apparatus and Reagents. Beckman Model DU spectrophotometer with glass cells. 100 ml standard flasks coated with Krylon black acrylic spray, except for small vertical areas on opposite sides near the top gratuation.

1% *(W/V) NaCN solution.* Dissolve 10.0 g A.R. NaCN in distilled water and dilute to one litre.

$Fe(NO_3)_3$-HNO_3 solution. Dissolve 300 g A.R. $Fe(NO_3)_3 \cdot 9\,H_2O$ in distilled water, add 400 ml (55%) HNO_3 solution and dilute to one litre.

0.1 M $CuCl_2$ solution. Dissolve 17.05 g Analar $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ in distilled water and dilute to one litre.

10% *(V/V) Ammonia solution.* Dilute 100 ml concentrated ammonia solution (25% NH_3) to one litre with distilled water.

10% (V/V) acetic acid solution. Dilute 100 ml A.R. glacial acetic acid to one litre with distilled water.

Procedure. *(A) Maximum amount of SCN^- present* (Note 1). Neutralize one aliquot of the sample with 10% NH_4OH and/or 10% acetic acid solution using phenolphthalein indicator. Dilute to about 60 ml and add 5 ml 1% NaCN solution. After 12 min (Note 2), add 3 ml 0.1 M $CuCl_2$ solution with swirling and mix well (Note 3). Transfer the solution to an 100 ml opaque flask using the minimum volume of wash water (Note 4). Add 5 ml mixed $Fe(NO_3)_3$—HNO_3 reagent, dilute to 100 ml and mix thoroughly.

(B) Free SCN^- together with SCN^- formed directly from Polythionates. The procedure in this case is very nearly identical to (*A*) above; the only differences are that the solution is transferred to the 100 ml opaque flask immediately after the NaCN addition, and that the $Fe(NO_3)_3$—HNO_3 reagent is added after the 12 min period of cyanolysis, and this is followed by the $CuCl_2$ addition (Note 5).

(C) Free SCN^- (Note 6). This is determined in a sample blank. The procedure is similar to (*A*) and (*B*) above, but the neutralization step may be omitted. In this case the sample is transferred directly to an 100 ml opaque flask. The $Fe(NO_3)_3$—HNO_3, NaCN and $CuCl_2$ reagents are added in this order (Note 7).

Reagent Blank. Using 50 ml of distilled water, prepare a reagent blank using the procedure in (*C*) above.

Measurement of Transmittancy. Using suitable cells, measure the transmittancy at 460 nm wavelength of solutions (*A*), (*B*) and (*C*) against the reagent blank in the reference cell.

Determine the amounts of SCN^- in (*A*), (*B*) and (*C*) by reference to a calibration curve (Note 8).

Calculations. The difference between the amounts of SCN^- found in (*A*) and (*B*) corresponds to the $S_2O_3^{2-}$ formed from the polythionate on cyanolysis (assuming there is no free $S_2O_3^{2-}$ originally present). The difference between the amounts of SCN^- found in (*B*) and (*C*) corresponds to the SCN^- formed directly from the polythionate on cyanolysis. The mean sulphur content may be calculated by the formula:

$$n = \frac{(B)-(C)}{(A)-(B)} + 3.$$

The concentration of polythionate present may be calculated using the expression:

$$\text{mmols} \cdot S_nO_6^{2-}/\text{litre} = \frac{(A)-(B)}{58.08} \cdot \frac{1000}{\text{aliquot used}},$$

which is based on the fact that one molecule of polythionate forms one molecule of thiosulphate on cyanolysis. [(*A*) and (*B*) are expressed in mg of SCN^-].

When free thiosulphate is present, the amount of SCN^- equivalent to it must be determined. This quantity is subtracted from (*A*) to give $(A)_1$ which must then replace (*A*) in the above formulae.

When trithionate is present, this should be determined. Since trithionate is 1.6% cyanolysed in 12 min under these conditions (1% NaCN solution), the amount of SCN^- formed from the $S_3O_6^{2-}$ can be calculated. This quantity must be subtracted from (*A*) or $(A)_1$ and from (*B*) to give $(A)_2$ and $(B)_2$ which then replace (*A*) or $(A)_1$ and (*B*) in the above formulae.

Note 1. This solution contains free SCN^-, SCN^- formed directly from polythionate, from free thiosulphate and from thiosulphate formed from polythionate on cyanolysis.

Note 2. A reaction time of 12 min is chosen because trithionate is 1.6% cyanolysed in this time while the higher polythionates are completely cyanolysed. This enables a correction for $S_2O_6^{2-}$ to be made.

Note 3. Adequate mixing is essential during and just after the $CuCl_2$ addition in order to avoid the formation of an insoluble precipitate.

Note 4. The ferric reagent is added *after* the solution has been transferred to the opaque flask. This is because the ferric-thiocyanate colour fades in daylight.

Note 5. By adding the $CuCl_2$ reagent to the strongly acid solution, thiosulphate cyanolysis does not occur.

Note 6. When free SCN^- is absent, (*C*) is omitted.

Note 7. This prevents the cyanolysis of polythionates and free thiosulphate.

Note 8. A calibration curve may be plotted from calibration data such as are obtained in the experimental section.

The same calibration data as given in Table 1 of paper I of this series[9] are used. These are obtained by analysing aliquots of a standard solution of sodium thiosulphate (e.g. 0.124 g A.R. $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ per 500 ml solution), using procedure (*A*) above; the equivalent amount of SCN^- formed in each is calculated. It has been shown in paper I[9] that conversion of thiosulphate to thiocyanate under these conditions is quantitative.

A series of experiments were carried out in which the values of (*A*), (*B*) and (*C*) and *n* were determined on aqueous solutior s of polythionate

salts, both with and without the presence of free thiocyanate. The results obtained are given in Tables 1 and 2. It is emphasized that these polythionate salts, with the exception of $K_2S_4O_6$, were found to be mixtures containing between four and six polythionates from $K_2S_4O_6$ upwards[8].

Table 1. *Colorimetric Evaluation of Aqueous Polythionate Solutions*

Salt	Age of solution (days)	Aliquot (ml)	(*A*) SCN^- (mg)	(*B*) SCN^- (mg)	Colorimetric result *n*	Titrimetric result *n*	Remarks
$K_2S_4O_6$	5	—	0.714	0.379	4.13	—	
$K_2S_4O_6$	Fresh	—	0.885	0.471	4.14	4.00	
$K_2S_5O_6$	Fresh	5	0.490	0.276	4.29	4.44	
$K_2S_5O_6$	1	5	0.490	0.277	4.30	—	
$K_2S_5O_6$	2	10	0.968	0.553	4.33	—	
$K_2S_5O_6$ (sample 2)	Fresh	10	0.801	0.458	4.34	4.38	
$K_2S_5O_6$ (sample 2)	1	10	0.797	0.455	4.33	—	
$K_2S_6O_6$	Fresh	10	1.17	0.819	5.35	5.30	*n* decreases as sulphur precipitates on aging
$K_2S_6O_6$	Fresh	10	1.17	0.797	5.16	—	
$K_2S_6O_6$	2	10	1.08	0.722	5.04	5.05	
$K_2S_6O_6$	4	10	1.03	0.670	4.87	—	

Table 2

Colorimetric Evaluation of Aqueous Thiocyanate-bearing Polythionate Solutions

Salt	Present	Free SCN^- added mg	(*C*) Free SCN^- found mg	(*A*) SCN^- mg	(*B*) SCN^- mg	*n*
$K_2S_4O_6$	NH_4CNS	0.236	0.236	—	—	—
$K_2S_4O_6$	NH_4CNS	0.236	—	1.09	0.690	4.13
$K_2S_4O_6$	—	—	—	0.872	0.453	4.08
$K_2S_5O_6$	NH_4CNS	0.236	0.236	—	—	—
$K_2S_5O_6$	NH_4CNS	0.236	—	0.620	0.456	4.34
$K_2S_5O_6$	—	—	—	0.395	0.216	4.21
$K_2S_6O_6$	NH_4CNS	0.236	0.235	—	—	—
$K_2S_6O_6$	NH_4CNS	0.236	—	0.801	0.627	5.24
$K_2S_6O_6$	—	—	—	0.574	0.392	5.16

From Table 1, it is seen that with pure polythionate solutions excellent agreement was obtained between the colorimetric and titrimetric values of *n*. Details of the titrimetric methods used are given elsewhere[8]. This is regarded at the same time as evidence which substantiates the validity of both methods.

The presence or absence of free thiocyanate with the polythionate does not have a significant effect on the value of n as determined by this colorimetric method (see Table 2).

Polythionates are more stable and are often formed in acid solution. In these samples it is necessary to neutralize with ammonia solution, as indicated in procedures (*A*) and (*B*) above. It is possible that this neutralization would cause partial alkaline hydrolytic decomposition of the polythionates. However, according to KURTENACKER[1], this can be avoided if the required amount of ammonia (as determined in a trial titration) is added after the 1% NaCN solution in procedures (*A*) and (*B*). Using a $K_2S_6O_6$ solution in sulphuric acid ($\pm$ 0.1 N), this principle was used to estimate the amount of alkaline decomposition that could arise during ammonia neutralization (Table 3).

Table 3. *Alkaline Decomposition of Polythionates during Neutralization*

Solution	1st Addition	2nd Addition	(*A*) mg SCN^-	(*B*) mg SCN^-	n
$K_2S_6O_6$ in 0.1 N H_2SO_4	NH_4OH	NaCN	0.351	0.231	4.84
	NaCN	NH_4OH	0.352	0.228	4.90

From Table 3 it is seen that alkaline decomposition in this way is negligible. However, in some cases, e.g. when NaOH is used for neutralization, more serious decomposition has been found[3].

Discussion. In view of its greater simplicity and reproducibility, this colorimetric method is preferred for the analysis of dilute solutions to the iodimetric method mentioned earlier[1,8]. The difficulties of using standard millinormal iodine solution are avoided, as well as the elaborate dead-stop method of titration. At the same time the colorimetric method has the advantage of determining free thiocyanate. The precision of the method is seen to be very good, and is of the order of 2% or less. Comparison with titrimetric results indicates that the accuracy is within about 3% or less of the true result.

Summary

Based on a spectrophotometric method for tetrathionate and a colorimetric method for thiosulphate, a method for the analysis of polythionate solutions is proposed. This method also enables the mean value of n in the formula $S_nO_6^{2-}$ to be determined for the polythionates above trithionate that are present. At the same time free thiocyanate is determined. Corrections for the presence of thiosulphate and or trithionate can easily be made.

References

[1] KURTENACKER, A.: Analytische Chemie der Sauerstoffsäuren des Schwefels. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1938, S. 154. — [2] NIETZEL, O. A., and M. A. DE SESA: Analyt. Chemistry **27**, 1839 (1955); cf. Z. analyt. Chem. **152**, 361 (1956). —

[3] ROBINSON, R. E.: Anglo American Corporation of South Africa Ltd. Report dated December 1954. — [4] ROBINSON, R. E.: Government Met. Lab. Progress Reports (leaching series) Nos. 133 & 175. — [5] SCHMIDT, M.: Private communication (1957). — [6] SCHMIDT, M.: Z. anorg. allg. Chem. **289**, 193 (1957). — [7] SÖRBO, B.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **23**, 412 (1957); cf. Z. analyt. Chem. **159**, 142 (1957/58). — [8] URBAN, P. J.: Thesis submitted for Ph.D., 1958. Univ. of the Witwatersrand, Milner-Park, Johannesburg. — [9] URBAN, P. J.: Z. analyt. Chem. **179**, 415 (1961). — [10] URBAN, P. J.: Z. analyt. Chem. **179**, 422 (1961). — [11] WEITZ, E., and K. SPOHN: Chem. Berichte **89**, 2332 (1956).

Dr. P. J. URBAN, c/o Industrial Distributors (1946) Ltd., P.O. Box 916, Johannesburg (South Africa)

Government Metallurgical Laboratory, University of the Witwatersrand, Milner Park, Johannesburg (South Africa)

Colorimetry of Sulphur Anions

Part IV*

Colorimetric Evaluation of Sulphur Sols

By
P. J. URBAN

(Received December 5, 1960)

According to BASSETT and DURRANT[1], sulphur sols consist of sulphur particles or micelles of different sizes, some containing large and others small numbers of sulphur atoms. These sulphur particles are stabilized by polythionates — shown by chromatography to consist of six polythionates starting with tetrathionate[3]. These polythionates are bound to the micelles or exist in equilibrium with them in solution. Thus assuming that a atoms of sulphur are associated with one molecule of polythionate, $S_xO_6^{2-}$, in the sol, we can represent the sol by the anionic formula:

$$(S_a)S_xO_6^{2-} = S_{(a+x)}O_6^{2-}.$$

When $(a + x)$ is replaced by n, we obtain the formula: $S_nO_6^{2-}$, i.e. a formula corresponding to the polythionates. WEITZ et al.[5] are in agreement with this formula.

It has been confirmed experimentally that elemental sulphur reacts with cyanide as in the equation:

$$S + CN^- = SCN^-,$$

* Part III.: URBAN, P. J.: Z. analyt. Chem. **180**, 110 (1961).

and since the lower polythionates are known to undergo cyanolysis according to the equation:

$$S_nO_6^{2-} + (n-3)\,CN^- + 2\,OH^- = S_2O_3^{2-} + (n-3)\,SCN^- + SO_4^{2-} + H_2O,$$

it can be deduced that this latter equation will also apply to sulphur sols. Thus it should be possible, by applying the principles in paper III of this series[4], to determine the sulphur concentration and "n value" of sulphur sols; this has been achieved and is described here.

Generally speaking, sulphur sols have n values ranging from 15 to 140[5]. Thus, for example, in the case of a sol with $n = 50$, the relative amounts of thiocyanate formed in procedures (A) and (B) will be in the ratio of 48 to 47. This represents a very small difference between two large quantities of thiocyanate, and, as a result of this, errors in the determinations will be considerably magnified in the value of n that is calculated by the formula:

$$n = \frac{(B)-(C)}{(A)-(B)} + 3,$$

where this difference occurs in the denominator.

Experimental

Apparatus and Reagents. These are exactly as described in paper III of this series[4].

Procedure. The procedure for the determination of (A), (B) and (C) is almost identical to that described in paper III[4]. The only difference is that a reaction time of 90 min is used in (A) and (B) — instead of 12 min as described in paper III.

Calculations. The mean sulphur content n of the sol represented by the formula $S_nO_6^{2-}$ is given by:

$$n = \frac{(B)-(C)}{(A)-(B)} + 3.$$

In cases where free thiocyanate is absent,

$$n = \frac{(B)}{(A)-(B)} + 3.$$

The concentration may be calculated by:

$$\text{mmol } S_nO_6^{2-} \text{ per litre} = \frac{1000}{\text{Aliquot}} \cdot \frac{(A)-(B)}{58.08}$$

$$\text{mg S/litre} = (\text{mmol } S_nO_6^{2-}/\text{ litre}) \cdot n \cdot 32.06.$$

A sulphur sol was prepared according to the method of Bassett and Durrant[1], using $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ and H_2SO_4. Unfortunately circumstances did not permit the removal of the sulphur precipitate after 2—3 hours, as these authors recommend, but only after $2^2/_3$ days; it may be for this reason that n values of the order of 17 were obtained, instead of about 60 as was found by Bassett and Durrant.

After 21 days this sol was diluted one hundred-fold. 5 and 10 ml aliquots were analysed by the procedures in paper III[4] and n values of 22.0 and 13.4 were obtained respectively. At the same time it was observed that the solutions were cloudy when introduced into the colorimetric cells. Thus it appeared that incomplete cyanolysis had occurred; possibly only the stabilizing polythionate was cyanolysed, resulting in coagulation of the elemental sulphur; this could explain the above discrepancy. Thus a study of the rate of cyanolysis became necessary.

10 ml aliquots of the diluted sol were cyanolysed according to procedure (B) in paper III[4], using various times of cyanolysis. The results obtained are shown in Table 1.

Table 1. *Rate of Cyanolysis of a Sulphur Sol*
Temperature 22.5° C

Time (min)	% Tr (1 cm)	SCN^- found mg	% Reaction	Remarks
6	82.7	0.132	37.5	solution cloudy
12	77.2	0.179	50.9	less cloudy
20	69.3	0.205	58.3	clear
30	62.9	0.324	92.0	clear
37	62.0	0.334	94.8	clear
45	61.4	0.342	97.1	clear
60	61.0	0.346	98.3	clear
75	60.9	0.347	98.6	clear
90	60.5	0.352	100	clear

From this Table it is clear that cyanolysis is only approximately complete in 90 min. Using this time of cyanolysis, the former experiments were repeated giving the improved results in Table 2.

Table 2. *Colorimetric Analysis of a Sulphur Sol*

ml sol	Procedure	SCN^- found mg	Mean mg	n Value
5	(A)	0.393	0.394	15.6
5	(A)	0.395		
5	(B)	0.365	0.365	
5	(B)	0.365		
10	(A)	0.822	0.821	17.5
10	(A)	0.820		
10	(B)	0.772	0.768	
10	(B)	0.764		

It is seen in this Table that the agreement between the two n values is within 15%. Small errors in (A) and (B) give rise to large errors in n.

An attempt to check these n values by means of iodimetry after URBAN[3] did not give good agreement. An n value of 12.9 was obtained.

It should be noted however that in a recent publication, MAURICE[2] finds results approximately 15% low for the sulphite method used in iodimetry. Thus this figure is not reliable.

The above experiment using 10 ml diluted sol was repeated 2 days later, and a decrease in n value was found (see Table 3).

Table 3

ml sol	Procedure	% Tr (1 cm)	SCN^- (mg)	Mean	n
10	(*A*)	33.2	0.771	0.770	15.73
10	(*A*)	33.3	0.769		
10	(*B*)	35.9	0.716	0.714	
10	(*B*)	36.1	0.712		

Present Conclusion. Using present measurements, very great accuracy cannot be expected in the results for n values. It is hoped in the future to apply precision colorimetry to the determination of the difference $(A)-(B)$, and that a ten-fold increase in accuracy may result.

Summary

The colorimetric method for the determination and evaluation of polythionates above trithionate has been adapted for use in conjunction with sulphur sols. This has been achieved simply by increasing the period of cyanolysis. The method gives good results for the concentration of sulphur. The n values in the formula $S_nO_6^{2-}$, which also represents sulphur sols, are not very accurate, but the accuracy might be increased by high precision colorimetry. However, they do serve to distinguish between polythionates and colloidal sulphur.

References

[1] BASSETT, H., and R. G. DURRANT: J. chem. Soc. (London) **1931**, 2919. — [2] MAURICE, M. J.: Thesis. The Determination of Sulphur and its Compounds in Rayon. Uitgeverij "Excelsior". Oranjeplein 96. 'S. Gravenhage. 1956. — [3] URBAN, P. J.: Thesis submitted for PhD, 1958. Univ. of the Witwatersrand, Milner Park, Johannesburg. — [4] URBAN, P. J.: Z. analyt. Chem. **180**, 110 (1961). — [5] WEITZ, E., F. BECKER, K. GIELES and B. ALT: Chem. Berichte **89**, 2353 (1956).

Dr. P. J. URBAN, c/o Industrial Distributors (1946) Ltd., P.O. Box 916, Johannesburg (South Africa)

Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie

I. Allgemeine analytische Methoden, Apparate und Reagentien

Röntgenfluorescenzspektralanalyse. Am Beispiel der *Chrombestimmung in niedrig legierten Stählen neben Vanadium und Mangan mittels Röntgenfluorescenzspektralanalyse* zeigt P. D. ZEMANY[1], daß es nicht unbedingt erforderlich ist, nur völlig ungestörte Linien zu vermessen. Auch wenn das Auflösungsvermögen einer Apparatur nicht ausreicht, Cr K_α von V K_β zu trennen, ist eine Analyse möglich durch Anbringen von Korrekturen in ganz analoger Weise, wie dies von der optischen Emissionsspektralanalyse her wohlbekannt ist. Der besonders einfache Fall, daß V K_α ungestört ist und so direkt die Korrekturgröße gewonnen wird, bespricht Verf. ausführlich und gibt an, wie die Bestimmungsgleichungen aufzustellen sind.

[1] Spectrochim. Acta **16**, 736—741 (1960). Res. Lab., General Electric Co., Schenectady, N. Y. (USA). S. ECKHARD

Elektrophorese. B. W. GRUNBAUM und P. L. KIRK[1] haben eine früher beschriebene Anordnung[2] für die Mikroelektrophorese so verbessert, daß zuverlässig auch noch Substanzmengen von nur 0,01—0,1 μl, und daß gleichzeitig auch mehrere Proben und diese im frei horizontal hängenden Streifen analysiert werden können. Die Verbesserungen betreffen vor allem den Streifenhalter (Abb. 1) mit maximal aus dem 13,5 × 2,7 cm großen Papierbogen geschnittenen 8 cm langen Streifen, die

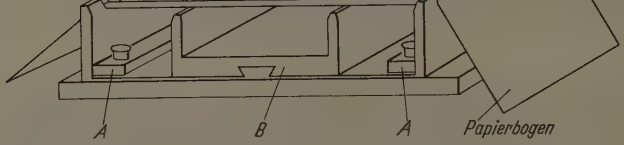

Abb. 1. Anordnung zur Mikroelektrophorese nach GRUNBAUM und KIRK

durch das mehr oder weniger starke Anspannen des Halters *A* an den Metallträgern gespannt werden und die bei Auftragen der Probe durch die Unterlage *B* gestützt werden, die gleichzeitig die Auftragsstellen auf allen Seiten fixiert. Die kompakten Bogenenden tauchen in mit den Elektrodenkammern verbundene Zwischenkammern mit Pufferlösung. In geschlossener Kammer werden sehr gut reproduzierbare Pherogramme erhalten, wenn z. B. Tinte mit Acetatpufferlösung (0,2 g Natriumacetat und 0,05 ml Eisessig im Liter) mit 15—25 V/cm 3—5 min (etwa 1 Milliamp. Stromstärke) elektrolysiert wird oder Blutserum in Veronalpufferlösung (0,1 m, p_H 8,6) 2 Std mit 200 V (etwa 0,7 Milliamp.) oder Ferritinlösung 45 min bei der gleichen Spannung.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 564—566 (1960). Univ. California, San Francisco u. Berkeley, Calif. (USA). — [2] KARLER, A., C. L. BROWN u. P. L. KIRK: Mikrochim. Acta (Wien) **1956**, 1585; vgl. diese Z. **157**, 442 (1957). K. CRUSE

Die Verwendung von Lithiumchlorid als Zusatz bei nichtwäßrigen potentiometrischen Messungen oder Titrationen, die schon von J. S. Fritz und N. M. Lisciki[1] empfohlen worden ist, um den Widerstand zwischen den Elektroden zu verringern und die Stabilität des Instruments zu erhöhen, wird von E. L. Grove[2] kritisch untersucht. Verf. benutzt ein Glas/Kalomel-Elektrodenpaar oder bei Verwendung von Chlorbenzol, Dioxan und Benzol als Lösungsmittel ein Glas-Silber/Silberchlorid-Elektrodenpaar. Eine wirkliche Verbesserung der Stabilität durch Zugabe von Lithiumchlorid zeigt sich bei der *Titration schwacher Säuren mit Natriummethylat* in neutralem oder schwach alkalischem Lösungsmittel. Bei der Titration von *Benzoesäure* oder *Stearinsäure* in Benzol-Methanol ($\gtrsim$ 4:1) beobachtet man z. B. eine Steigerung der Stabilität durch LiCl, ebenfalls noch gut bei der Titration von Benzoesäure in Benzol-Methanol (50:1); dagegen war die Titration in reinem Benzol unmöglich. Derselbe Effekt ergab sich bei der Titration von Benzoesäure in Dimethylformamid. Bei Verwendung dieser beiden Lösungsmittel und der genannten Elektrodenanordnung bewirkt LiCl eine Steigerung von $\Delta E/\Delta V$ nahe dem Endpunkt. In sauren Lösungsmitteln, z. B. bei der Titration von *Aluminiumoxinat* und *Pyridin* mit 0,1 n Perchlorsäure in Eisessig als Lösungsmittel oder der Titration von Pyridin mit Perchlorsäure in Chlorbenzol ergibt sich keine Verbesserung der Stabilität durch LiCl-Zusatz, ebensowenig mit G-H-Mischung als Lösungsmittel.

[1] Analyt. Chemistry **23**, 589 (1951); vgl. diese Z. **137**, 217 (1952/53). — [2] Talanta (London) **4**, 205—206 (1960). School of Chem. Univ. Alabama (USA).

Liselott Johannsen

Über die potentiometrische Titration von Säuren in nichtwäßriger Lösung mit Tetraäthylammoniumhydroxyd berichten A. P. Krešков, L. N. Bikova und N. A. Mchitarjan[1]. Als Lösungsmittel dienen Ketone, besonders Methyläthylketon, als Maßlösung wird eine Lösung von Tetraäthylammoniumhydroxyd in Benzol-Methanol (5:1) verwendet. Titriert wird in Stickstoffatmosphäre, als Indicatorelektrode dient die Glaselektrode, als Bezugselektrode eine Kalomelelektrode. Es können starke, schwache und sehr schwache Säuren einzeln oder in Gemischen titriert werden. An sehr schwachen Säuren werden Phenol, Kresole, Thymol, Hydrochinon, Resorcin, Pyrogallol, α- und β-Naphthol usw. in Methyläthylketon bestimmt, wobei der Fehler $\pm$ 2% beträgt. Auch in Wasser unlösliche organische Säuren (Stearinsäure, Ölsäure) können auf $\pm$ 1% genau bestimmt werden. Sind mehrere Komponenten nebeneinander vorhanden, ist eine Differenztitration möglich, wenn die Unterschiede zwischen den einzelnen Potentialsprüngen wenigstens 100 mV betragen. Als Beispiele werden Titrationen von Gemischen verschiedener Mono-, Di- und Trinitrophenole angeführt.

[1] Dokl. Akad. Nauk SSSR **132**, 1090—1092 (1960) [Russisch]. Mendeleev-Chem.-technol. Inst., Moskau.

O. Gautsch

Als Urtitersubstanz für die Alkalimetrie und Chelatometrie wird von J. E. Powell, J. S. Fritz und D. B. James[1] *Cadmium-N-hydroxyäthyl-(äthylendinitrilo)-N-N'-N'-triessigsäure* (HCdV) empfohlen. Die Verbindung ist eine starke Säure, kristallisiert wasserfrei, ist nicht hygroskopisch, hat ein hohes Molekulargewicht (388,66) und ist bis 110° C unbegrenzt haltbar. Bei chelatometrischen Titrationen wird die Lösung einige Minuten mit Kaliumperoxydisulfat gekocht, um die organische Substanz zu zerstören. — Zur *Darstellung* löst man eine Mischung aus 0,444 Teilen Cadmiumcarbonat und 0,716 Teilen käuflicher N-Hydroxyäthyl-(äthylendinitrilo)-N-N'-N'-triessigsäure in 18 Teilen kochenden Wassers, filtriert durch einen Glasfiltertiegel und läßt unter Rühren, gegebenenfalls über Nacht, abkühlen. Die ausgeschiedenen Kristalle filtriert man durch einen Glasfiltertiegel, wäscht mit Wasser

und kristallisiert aus 15 Teilen kochenden Wassers um. Die Kristalle werden erst einige Stunden bei 110° C getrocknet, dann pulverisiert und schließlich über Nacht auf 110° C erhitzt. — Die Einstellung von Kalilauge erfolgt potentiometrisch; HCdV geht bei p_H 7,4 in KCdV über. — Um ÄDTA-Lösungen einzustellen, löst man 1 g HCdV in 800 ml Wasser, stellt mit konz. Schwefelsäure p_H 1,3 ein, erhitzt zum Sieden, gibt 1,26 g Kaliumperoxydisulfat hinzu und kocht 2—3 min. Nach dem Abkühlen versetzt man die Lösung mit einigen Millilitern Pyridin, stellt mit Ammoniak p_H 5,5—6 ein, gibt 10 Tr. einer 0,03 m HCuV-Lösung und einige Tropfen Naphthylazoxinindicator hinzu und titriert mit 0,05 m ÄDTA-Lösung bis zum Umschlag nach Rosa. Der Endpunkt kann auch spektrophotometrisch bei 440 nm ermittelt werden.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 954—957 (1960). Inst. Atomic Res. und Dpt. Chem., Univ. Ames, Iowa (USA). G. Denk

Titrationsmethoden mit Hexacyanoferrat(III) als Oxydans. F. Solymosi[1] befaßt sich kritisch mit dem Übersichtsartikel von B. R. Sant und Suseela B. Sant[2] und bemängelt unter anderem, daß in dem Artikel einige Arbeiten von Solymosi nicht oder nicht richtig behandelt worden sind. B. R. Sant und Suseela B. Sant[3] weisen die Angriffe zurück.

[1] Talanta (London) **4**, 211 (1960). Univ. Szeged (Ungarn). — [2] Talanta (London) **3**, 261 (1960); vgl. diese Z. **177**, 434 (1960). — [3] Talanta (London) **4**, 212 (1960). Univ. Toronto, Ontario (Canada). A. Kurtenacker

Neue colorimetrische Anwendungen des Systems Kaliumhexacyanoferrat(III)-o-Dianisidin. *Zur indirekten colorimetrischen Bestimmung von Sn^{II}* wird nach J. Artigas, F. Buscarons und C. Rodríguez-Roda[1] das Sn^{II} mit einer bekannten Menge Hexacyanoferrat(III) im Überschuß versetzt und das nicht verbrauchte Hexacyanoferrat(III) colorimetrisch mit o-Dianisidin bestimmt. — *Arbeitsweise.* In einen 25 ml-Meßkolben gibt man 1 ml Kaliumhexacyanoferrat(III)-lösung (200 μg/ml), 2 ml 6 n Natronlauge und die Sn^{II}-Lösung. Dann fügt man 10 ml Wasser, 5 ml 6 n Schwefelsäure, 0,5 ml m Zinksulfatlösung und 0,5 ml der o-Dianisidinlösung zu (0,5 g in 50 ml Aceton gelöst und nach Lösung mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt) und füllt mit Wasser auf 25 ml auf. 5 min nach Zugabe der Reagenslösung wird innerhalb $^1/_2$ Std bei einer Wellenlänge von 470 nm colorimetriert. Zur Auswertung stellt man eine Eichkurve mit 3—4 Eichpunkten her. Das Beersche Gesetz ist von 0,5—60 μg/ml Sn^{II} erfüllt.

Dasselbe Prinzip verwenden J. Artigas, F. Buscarons und C. Rodríguez-Roda[2] zur *Bestimmung von As^{3+}, $S_2O_3^{2-}$, $S_2O_4^{2-}$ und H_2O_2.* Die geringste bestimmbare Konzentration beträgt 0,2 μg/ml. — *Arbeitsweise.* In einen 100 ml-Meßkolben gibt man 4 ml Kaliumhexacyanoferrat(III)-lösung (200 μg/ml), 2 ml 2 n Natronlauge und die zu bestimmende Lösung. Nach 5—15 min säuert man mit 6 n Schwefelsäure auf p_H 1—2 an, gibt 0,5 ml m Zinksulfatlösung und 0,5 ml Reagenslösung zu (0,5 g o-Dianisidin in 50 ml Aceton gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt). Nach 5 min wird die colorimetrische Messung bei einer Wellenlänge von 470 nm durchgeführt. — Bei der Arsenbestimmung wird das As zuerst mit Natronlauge auf ein p_H von 12 eingestellt und dann mit Hexacyanoferrat versetzt. Die weitere Bestimmung verläuft wie oben angeführt.

In der gleichen Weise wie in den vorhergehenden Mitteilungen werden von J. Artigas, F. Buscarons und C. Rodríguez-Roda[3] *Mercaptoverbindungen* wie Thioglykolsäure, 2-Mercaptopropionsäure, Thiomalonsäure und Thioglycerin bestimmt. Die untere Bestimmungsgrenze beträgt 0,2 μg/ml. Die Ausführung gleicht der für Thiosulfat angegebenen.

[1] An. Soc. españ. Física Quím., Ser. B, **56**, 369—372 (1960). Catedra de Quím. Anal., Seccion Quím. Anal. del Inst. „Alonso Barba", Univ. Barcelona (Spanien). —

[2] An. Soc. españ. Física Quím., Ser. B, **56**, 373—376 (1960). Catedra de Quím. Anal., Seccion de Quím. Anal. del Inst. „Alonso Barba", Univ. Barcelona (Spanien). — [3] An. Soc. espan. Física Quím., Ser. B, **56**, 377—378 (1960). Catedra Quím. Anal., Inst. „Alonso Barba", Univ. Barcelona (Spanien). IRMGARD PFITZER

Die Reaktionen von α-Benzoinoxim mit Molybdän, Wolfram, Vanadium und Chrom untersuchen H. J. HOENES und K. G. STONE[1] im Hinblick auf ihre analytische Verwertbarkeit. Bei den Fällungsversuchen wird in der Lösung der gewünschte p_H-Wert eingestellt und eine Lösung von α-Benzoinoxim in 50%igem Aceton oder Äthanol dazugegeben. Nach einiger Zeit wird der Niederschlag filtriert, gewaschen und bei 105° C getrocknet. — Die Extraktion zur colorimetrischen Bestimmung wird mit einer Lösung von α-Benzoinoxim in Chloroform ausgeführt. — *Molybdän* wird quantitativ als $MoO_2(C_{14}H_{12}O_2N)_2$ gefällt, wenn der p_H-Wert der Lösung < 2 ist. Pd und W stören, Nb, Si und Ta werden vorher aus saurer Lösung ausgeschieden. V^V und Cr^{VI} können mit schwefliger Säure oder Mohrschem Salz reduziert werden. Ist Fe^{III} anwesend, so wird der Niederschlag zunächst mit 1%iger Schwefelsäure und dann erst mit 50%igem Aceton gewaschen. — *Ausführung der gravimetrischen Molybdänbestimmung.* 25 ml der Lösung, die 5%ig an Schwefelsäure ist und 8—20 mg Mo enthält, versetzt man mit einem Überschuß von Ammoniumeisen(II)-sulfat und 10 ml einer 0,05 m Lösung von α-Benzoinoxim in 50%igem Aceton, filtriert nach 10 min durch einen Filtertiegel, wäscht mit 5 ml 1%iger Schwefelsäure, dann mit Wasser und schließlich 2 mal mit je 5 ml 50%igem Aceton. Der Niederschlag darf dabei nicht trocken gesaugt werden. Er wird bei 105° C zur Gewichtskonstanz getrocknet. — Zur *colorimetrischen Bestimmung* versetzt man die Probelösung, die 5%ig an Salzsäure ist, mit 5 ml KH_2PO_4-Lösung, (1 mg/ml) und 100 mg Mohrschem Salz, extrahiert mit Chloroform und verdünnt die Chloroformextrakte mit 95%igem Alkohol auf 100 ml. Die blaue Lösung wird im Spektrophotometer vermessen. — Mit *Wolfram* ist die Fällung nicht quantitativ und ebenso bereitet die Extraktion Schwierigkeiten. — *Vanadium* gibt bei p_H 2,8—2 mit α-Benzoinoxim einen gelben, bei p_H 1,5 nach langem Stehen einen weißen Niederschlag der Zusammensetzung $VO_2(C_{14}H_{12}O_2N)$, der aber nicht genügend rein für eine gravimetrische Bestimmung ist. Er kann jedoch bei p_H 2,2 mit Chloroform extrahiert werden. — *Ausführung.* 10 ml der salz- oder schwefelsauren Probelösung mit dem p_H-Wert 2,2 schüttelt man 1 min mit 10 ml einer 0,1%igen Lösung von α-Benzoinoxim in Chloroform. Den Chloroformextrakt gibt man in einen 100 ml-Meßkolben, der bereits 10 ml 0,1 %ige Lösung von Oxin in 95%igem Alkohol enthält. Die wäßrige Phase schüttelt man noch 2mal mit je 10 ml der Benzoinoximlösung und schließlich mit 10 ml Chloroform. Zu den vereinigten Extrakten gibt man 20 ml 95%igen Alkohol und füllt mit Chloroform zur Marke auf. Die Extraktion mißt man bei 550 nm gegen eine Blindlösung der Reagentien. Das Beersche Gesetz gilt von 5—80 μg V/ml der wäßrigen Ausgangslösung. — *Chrom(VI)* wird durch das Reagens so rasch reduziert, daß weder eine gravimetrische noch eine colorimetrische Bestimmung möglich ist.

[1] Talanta (London) **4**, 250—263 (1960). Dept. Chem. Univ. East Lansing, Michigan (USA). G. DENK

Die Zusammensetzung des ternären Systems Aluminiumnitrat-Salpetersäure-Wasser versuchen R. W. HENRY und G. L. BOOMAN[1] spektralphotometrisch zu bestimmen. Grundlage des Verfahrens ist die Messung der Absorption des Systems bei 295 nm und 2,667 μ. Die Absorption bei 295 nm ist eine direkte Funktion der gesamten Nitratkonzentration; zu der Absorption bei 2,667 μ tragen mehrere Lösungspartner, wie z. B. H_2O, H_3O^+, Hydrolysenprodukte des Nitrats, bei. Man bringt aus dem Grunde an der beobachteten Absorption bei dieser Wellenlänge eine

Korrektur für die Absorption des Wassers an; sie wird aus der Dichte des Wassers und den Einwaagen von Salpetersäure und Aluminiumnitrat errechnet. Zur Aufstellung des Eichdiagrammes trägt man die Absorption bei 295 nm gegen die korrigierte bei 2,667 μ für bekannte Systeme auf. Aus diesem zweidimensionalen Diagramm läßt sich dann die freie Säure und die Aluminiumkonzentration in etwa 1 m Lösung bestimmen. Zur genauen Unterrichtung sei auf das Original verwiesen.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 832—834 (1960). Atomic Energy Div., Phillips Petroleum Co., Idaho Falls, Idaho (USA). H. Specker

Zur Bestimmung des Prozentgehaltes von wäßrigen Lösungen bestimmen R. Fischer, E. Pinter und H. Auer[1] die *kritische Mischungstemperatur* der zu untersuchenden Lösung und einer Testflüssigkeit. Die Prüfung wird in einer Capillare auf dem Kofler-Mikroskopheiztisch vorgenommen. Verff. haben in umfangreichen Tabellen für 60 wäßrige Lösungen und binäre Flüssigkeitsgemische (hauptsächlich Arzneibuchlösungen) die kritischen Mischungstemperaturen mit 18 verschiedenen Testflüssigkeiten (Phenol, Butanol, Hexan u. a.) angegeben. Ausführlich behandelt werden die *Gehaltsbestimmung von Methanol, Äthanol, Essigsäure, Aceton* und *Isopropanol.*

In Anlehnung an die obigen Untersuchungen von Fischer hat F. Gölles[2] für die homologe Reihe *Oxalsäure-Malonsäure-Bernsteinsäure* die Mischungslückendiagramme mit prim. n-Butanol und sek. Butanol ermittelt. Verf. diskutiert die Unterschiede zwischen den Maximalwerten der Mischungslückendiagramme, ihren volumengleichen Temperaturwerten und den Werten der auf dem Heiztisch gefundenen Mikroeichkurve. Er kommt zu dem Schluß, daß die Mikrobestimmung in der Capillare jedem Makroverfahren überlegen ist.

[1] Pharmaz. Zentralhalle Deutschland **99**, 299—312 (1960). Pharmakognostisches Inst., Univ. Graz (Österreich). — [2] Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 429—447.
Margot Zimmermann

Mikrochemische Geräte. Im Anschluß an frühere Berichte[1] beschreiben A. Steyermark, H. K. Alber, V. A. Aluise, E. W. D. Huffman, E. L. Jolley, J. A. Kuck, J. J. Moran, C. L. Ogg und C. E. Pietri[2] mit gewohnter Genauigkeit drei weitere Typen von Mikropipetten, nämlich eine Folin-Pipette in zwei Größen (0,1 und 0,2 ml Kapazität), eine Auswaschpipette vom Pregl-Typus in vier Größen (0,1, 0,2, 0,5 und 1 ml Kapazität) und eine Mikrowägepipette (Pyknometer) für Dichtebestimmungen in den Größen 100 μl, 40—80 μl und 10—30 μl. In den beigegebenen Skizzen sind alle notwendigen Maße und sonstigen Einzelheiten eingetragen.

[1] Siehe u. a. Analyt. Chemistry **30**, 1702 (1958); vgl. diese Z. **169**, 47 (1959). — [2] Analyt. Chemistry **32**, 1045—1046 (1960). Committee on Microchemical Apparatus, Division of Analytical Chemistry, American Chemical Society. A. Kurtenacker

III. Analyse organischer Stoffe

1. Elementaranalyse

Die gleichzeitige Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff in organischen Substanzen soll, wie E. Kozłowski und Z. Ledóchowski[1] kurz schildern, im Halbmikromaßstab auf folgende Art gelingen: Die zu analysierende Verbindung (Einwaage von 10—20 mg) wird im Rohr im Sauerstoffstrom auf die

übliche Art verbrannt, Wasser und Kohlendioxyd werden in bekannter Weise gravimetrisch bestimmt. Die bei der Verbrennung entstandenen Stickstoffoxyde (falls eine stickstoffhaltige Verbindung untersucht wird) werden in einem mit Mangandioxyd gefüllten Absorber festgehalten und dort gravimetrisch (bzw. nach thermischer Desorption als freier Stickstoff auch gasometrisch) bestimmt; der MnO_2-Absorber befindet sich zwischen dem Wasser- und Kohlendioxydadsorber. Der während der Verbrennung freigesetzte elementare Stickstoff wird durch eine glühende, mit metallischem Kupfer gefüllte Röhre geleitet, wo der als Treibgas dienende Sauerstoff durch einen Kohlendioxydstrom ersetzt wird, der den Stickstoff in das Azotometer überführt. — Nach einigen mitgeteilten Beleganalysen stimmen die auf die angegebene Art erhaltenen Resultate mit den Ergebnissen der üblichen organischen Elementaranalyse gut überein. Die gesamte Analysendauer beträgt dabei nur etwa die Hälfte der sonst erforderlichen Zeit. Es scheint weiterhin die Möglichkeit zu bestehen, aus der Menge der bei der Verbrennung entstehenden Stickstoffoxyde Schlüsse über die Art der Stickstoffbindung in den analysierten Verbindungen zu ziehen.

[1] Roczn. Chem. **34**, 737—739 (1960) [Polnisch]. (Mit dtsch. Zus.fass.) Inst. f. Technol. d. Arzneimittel, Techn. Hochsch. Gdańsk (Polen). M. Hřivnáč

Eine Modifikation der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl nimmt R. B. Bradstreet[1] für Verbindungen vor, die ein inneres reduzierendes System erfordern. Verf. schlägt vor, an Stelle von Salicylsäure-Natriumthiosulfat Saccharose zu verwenden, da hierdurch die Reduktion bei viel niedrigeren Temperaturen erfolgen kann. Zum anschließenden Mineralisieren wird zwecks Erreichung einer höheren Temperatur an Stelle von konz. Schwefelsäure ein Gemisch von Schwefel- und Phorphorsäure verwendet. — *Arbeitsweise.* 0,1—0,2 g Probe werden in einem Kjeldahl-Kolben mit 25 ml eines Gemisches aus 70 Vol-% konz. Schwefelsäure und 30 Vol-% konz. Phosphorsäure sowie mit 0,5 g Saccharose versetzt und 1 Std bei 90—100° C belassen. Danach gibt man 0,1 g Selen sowie 18 g Kaliumsulfat hinzu und mineralisiert 1 Std durch kräftiges Kochen, wobei die Temperatur etwa auf 365° C ansteigt. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgt in bekannter Weise. — Während *Stickstoff in Pyridinringen* quantitativ erfaßt wird, können Pyrazolon, Antipyrin, Benztriazol sowie Nitroverbindungen, welche den Stickstoff an einem sekundären oder tertiären Kohlenstoffatom gebunden haben, nicht bestimmt werden.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 114—117 (1960). US Testing Comp., Inc., Hoboken, N. J. (USA). H. Garschagen

Die Bestimmung von Schwefel in organischen Verbindungen mit metallischem Silber als Absorbens untersucht J. P. Dixon[1]. Die gravimetrische Bestimmung des entstehenden Silbersulfates durch Ermittlung der Gewichtszunahme des Silberdrahtnetzes mit einer Quarzfadentorsionswaage liefert auch im Mikrogrammbereich gut reproduzierbare Ergebnisse[2]. Bei der titrimetrischen Bestimmung hingegen treten erhebliche Schwierigkeiten auf, insbesondere wird der Blindwert zu hoch gefunden und unterliegt starken Schwankungen. Der Verf. untersucht die in Betracht kommenden Störfaktoren, z. B. unvollständige Oxydation des Schwefels, unvollständige Absorption am Drahtnetz, unvollständige Überführung des Silbersulfates in Lösung. Zur Verbesserung der SO_2-Oxydation zu SO_3 wird hinter das eigentliche Verbrennungsrohr ein mit Wirbeleinbauten versehenes „Leerrohr" geschaltet und zur Erhöhung der Absorptionsfähigkeit an Stelle von Silberdrahtnetz elektrolytisch gefälltes Silber benutzt. Es wird nachgewiesen, daß der zu hohe Blindwert auf einen zwar geringen, jedoch stark wechselnden Salzgehalt des dest.

Wassers zurückzuführen ist, weil es hierdurch zur Bildung löslicher Silberionen kommt. Bei Verwendung von Leitfähigkeitswasser wird ein stets gleichbleibender, niedriger Blindwert gefunden. An Hand verschiedener Testsubstanzen wird die Genauigkeit und gute Reproduzierbarkeit der verbesserten Bestimmungsmethode im Bereich von 15—25 μg Schwefel bei einer Substanzeinwaage von etwa 25 mg nachgewiesen. Die Abweichung bei Parallelproben beträgt 1,0—1,2% relativ. — *Ausführung.* Das Absorptionsrohr wird auf eine Länge von 38 cm mit Glasperlen und auf eine Länge von 64 cm mit locker geschüttetem Silberpulver gefüllt. Die Füllung wird mehrfach mit kochendem Wasser unter durchperlendem Stickstoff, anschließend mit Alkohol und danach mit Äther gewaschen und unter Stickstoff getrocknet. Der zur Verbrennung dienende Sauerstoff gelangt über ein Rotameter in den mit drahtförmigem Kupferoxyd gefüllten Vorwärmer, wo er auf 900° C erhitzt und in einem nachgeschalteten Spülturm an Natronkalk gereinigt wird. Die Verbrennung erfolgt in einem Quarzrohr, die Nachverbrennung im „Leerrohr" bei 900° C. Das Absorptionsrohr wird auf einer Temperatur von 400—450° C gehalten. — *Bestimmung.* Eingewogen werden etwa 10 mg Substanz in ein Platinschiffchen, bei größeren Einwaagen (10—25 mg) ist ein einseitig geschlossenes Quarzröhrchen vorzuziehen. Die Verbrennung wird in der bei C-H-Bestimmungen üblichen Weise durchgeführt. Nach vollendeter Verbrennung wird das Absorptionsrohr unter Stickstoff im Gegenstrom abgekühlt. Das Silberpulver wird mit kochendem Wasser mehrfach unter durchperlendem Stickstoff gewaschen und die wäßrige Lösung (40 ml) in ein 100 ml-Becherglas gegeben. Es wird mit 0,1 n Kaliumjodidlösung potentiometrisch unter Verwendung eines Mikro-Glas/Silber-Elektrodenpaares, eines Magnetrührers und einer Büretten-Spritze titriert. 0,001 ml 0,1 n Kaliumjodidlösung entsprechen 1,6 μg Schwefel. — *Leitfähigkeitswasser* wird durch Aufgabe von dest. Wasser auf eine Ionenaustauschersäule erhalten, die mit einer Mischung von Amberlite IR 120 und Amberlite IRA 400 gefüllt ist. — Zur *Herstellung von elektrolytisch gefälltem Silber* werden 7 g Silbernitrat in 1000 ml 0,5%iger Salpetersäure gelöst. Die Anode besteht aus spiralig aufgewickeltem Silberdraht von 15 cm Länge und 1 mm Stärke, die Kathode aus Silberblech $100 \times 50 \times 0{,}5$ mm. Es werden 1,5 V Spannung angelegt. Das erhaltene kristallinische Silber wird gewaschen, getrocknet und unter Stickstoff aufbewahrt.

[1] Talanta (London) **4**, 221—226 (1960). „Shell", Thornton Research Centre, Chester (England). — [2] Kuck, J. A., u. E. C. Grim: Mikrochim. Acta (Wien) **1954**, 201; vgl. diese Z. **145**, 358 (1955). O. Abel

Geringe Mengen Schwefel in organischen Produkten, besonders *Polysacchariden,* bestimmen G. Zdybek, D. S. McCann und A. J. Boyle[1] turbidimetrisch als Bariumsulfat nach Oxydation mit Chlorsäure. Die Fehler betragen etwa 2%. — *Ausführung.* Man dampft die Probe, die bis zu 300 μg S enthalten kann, in einem 25×150 mm-Reagensglas mit 1 ml 10%iger Natriumnitratlösung und 4 ml 25%iger Chlorsäure (dargestellt aus Kaliumchlorat und Perchlorsäure) bei 120° C zur Trockne ein, kühlt ab, nimmt mit 1 ml gesätt. Ammoniumcarbonatlösung auf und dampft wieder ein. Nach dem Abkühlen löst man unter gelindem Erwärmen im Wasserbad mit 6 ml Wasser, gibt unter jedesmaligem Mischen bei Zimmertemperatur 0,03 ml konz. Salpetersäure, 4 ml einer Mischung aus 450 ml abs. Äthanol und 550 ml Dipropylenglykol sowie 5 ml Reagenslösung (siehe unten) hinzu, schüttelt 5mal über Kopf um und mißt nach 20—25 min die Trübung in einer 2 cm-Zelle bei 355 nm gegen eine Lösung der Reagentien. Die Werte entnimmt man einer Eichkurve. — Zur *Herstellung der Reagenslösung* filtriert man 100 ml 1,34 m $BaCl_2$-Lösung frühestens 3 Std nach der Darstellung durch Glasfilter, verdünnt 6 ml des Filtrats auf 120 ml und gibt 80 ml der Äthanol-Dipropylenglykolmischung hinzu.

Das Reagens, welches nach 2—3 Std verwendet werden kann, ist 40 Std haltbar. — Für alle Operationen wird deionisiertes Wasser verwendet.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 558—560 (1960). Wayne State Univ., Detroit, Mich. (USA). G. DENK

2. Qualitative und quantitative Analyse

Über die kernmagnetischen Resonanzspektren von gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen berichten C. N. BANWELL, N. SHEPPARD und J. J. TURNER[1]. Die Messungen wurden an *Vinylfluorid, -chlorid, -bromid* und anderen *Vinylverbindungen* sowie an *1,2-Dichloräthan, 1,2-Trichloräthan, 1,2-Tetrachloräthan* und *1,2-Dibromäthan* mittels eines Varian Associates V-4300 B NMR-Spektrometers bei konstanter Frequenz von 40 Me/sec durchgeführt und die erhaltenen Spektralfrequenzen mit der EDSAC elektronischen Rechenmaschine der Cambridge Univ. ausgewertet. Die erhaltenen cis-, trans- und H—H (von H—C—H) Kopplungskonstanten der substituierten Äthylene- und Verbindungen wiesen einen parallelen Verlauf mit der Elektronegativität der Substituenten auf. Bei den *substituierten Äthanen* lassen sich 2 Kopplungskonstanten (J_t/J_g) gemäß den theoretischen Annahmen von MIZUSHIMA[2] errechnen, die in Übereinstimmung mit den berechneten Werten[3] stehen.

[1] Spectrochim. Acta (London) **16**, 794—798 (1960). Univ. Chem. Lab., Cambridge (England). — [2] MIZUSHIMA, S.: Structure of Molecules and Internal Rotation p. 34. Academic Press, New York 1954. — [3] KARPLUS, M.: J. Chem. Physics **30**, 12 (1959). S. PRAKASH

Die quantitative Bestimmung papierchromatographisch getrennter aliphatischer Alkohole als Azobenzolcarbonsäureester-(4) beschreiben T. BEYRICH und R. POHLOUDEK-FABINI[1]. Die Alkohole werden unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen mit Azobenzolcarbonsäurechlorid-(4) umgesetzt, die Ester nach früheren Angaben[2] papierchromatographisch getrennt und nach Extraktion mit n-Heptan bei 322 nm photometrisch bestimmt. In ähnlicher Weise sind nach vorheriger Verseifung auch alkoholische Komponenten von Estern bestimmbar. — *Arbeitsweise. Eichkurve.* 50 mg Alkohol werden in einem 5 ml-Meßkölbchen genau gewogen und mit Benzol zur Marke aufgefüllt. Steigende Mengen von 0,1—0,4 ml werden in einem 10 ml-Schliffkölbchen mit 2 ml einer 6%igen Lösung (g/v) von Azobenzolcarbonsäurechlorid-(4) in Benzol und 0,1 ml Pyridin (reinst) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach kurzer Zeit fällt ein Niederschlag von Säurechlorid-Pyridinaddukt aus. Die Mischung erhitzt man auf dem Wasserbad 2 Std am Rückfluß, fügt nach dem Abkühlen 1—2 ml Benzol zu, schüttelt um und läßt über Nacht stehen. Danach wird der Niederschlag mittels einer Fritte 12 G3 abgetrennt, mit Benzol nachgewaschen und das Filtrat in einem 5 ml-Meßkölbchen mit Benzol zur Marke aufgefüllt. Ein beim Stehen sich etwa neu bildender geringer Niederschlag stört die Bestimmung nicht. Von dieser Lösung werden je 10—50 μl mehrfach auf mit 5% Paraffin imprägniertes Papier (Schl. & Sch. 2043a) aufgetragen, 5—6 Std in Heptanatmosphäre gesättigt und mit der wäßrigen Phase des Laufmittels Methanol-Wasser-Heptan (1000:72:250; g/g/v) auf- oder absteigend chromatographiert. Nach dem Trocknen an der Luft werden die Flecke unter der Analysenquarzlampe markiert, ausgeschnitten, über Nacht mit 2 ml Heptan extrahiert, und die Extinktion der Lösung wird in 0,5 cm-Quarzküvetten bei 322 nm gegen Heptan als Vergleichslösung gemessen. — *Probelösung.* Zu maximal 1 ml benzolischer Lösung des zu bestimmenden Alkohols, die je nach Art des Alkohols C_1—C_3 bis etwa 5 mg, C_4—C_7 bis etwa 10 mg und C_8—C_{12} bis etwa

15 mg enthalten soll, werden in einem 10 ml-Schliffkölbchen 2 ml einer 6%igen Azobenzolcarbonsäurechlorid-(4)-Lösung und 0,1 ml Pyridin zugesetzt und wie oben weiterbehandelt. — *Bestimmung von esterartig gebundenen Alkoholen.* Eine bis etwa 20 mg des zu erwartenden Alkohols entsprechende Menge des Esters in methanolischer Lösung bzw. in nicht mehr als 0,2 ml Benzol wird in einer 5 ml-Ampulle mit 2 ml 1 n methanolischer Kalilauge versetzt, wobei die Gesamtmenge in der Ampulle 3 ml nicht wesentlich übersteigen soll. Nach Zuschmelzen kocht man die Ampulle 2 Std in Methanol am Rückflußkühler. Anschließend wird der Inhalt der Ampulle in einen Scheidetrichter übergeführt, mit 8 ml Wasser gründlich nachgespült und die wäßrig-methanolische Lösung dreimal mit 3 ml Pentan je 2 min ausgeschüttelt. Die vereinigten Pentanauszüge trocknet man über Natriumsulfat. Das Pentan wird über einem Wasserbad vorsichtig abgedunstet und der Rückstand wie oben aufgearbeitet. — Auf Grund zahlreicher Beleganalysen ist bei einzelnen Alkoholen mit einem maximalen Fehler von $\pm$ 10% zu rechnen; bei Mehrkomponentensystemen steigt der Fehler auf $\pm$ 15%.

[1] Pharmazie **15**, 437—442 (1960). Pharmaz. Inst., Univ. Greifswald. — [2] Pohloudek-Fabini, R., u. T. Beyrich: Pharmazie **15**, 356 (1960). H. Garschagen

Zur gaschromatographischen Trennung und Bestimmung von langkettigen aliphatischen Aminen empfehlen W. E. Link, R. A. Morrissette, A. D. Cooper und C. F. Smullin[1] die Verwendung von *Apiezon-* und *Siliconfett* auf speziell präpariertem Trägermaterial. Mit den folgenden Säulenfüllmaterialien lassen sich C_8—C_{22}-Amine in Form symmetrisch ausgebildeter Peaks trennen. — 1. Chromosorb W, 40—60 mesh, wird mit konz. Salzsäure und danach mit Wasser säurefrei gewaschen. Man erhitzt 2 Std auf 200° C und siebt dann auf 40—60 mesh. 15,5 g des vorbehandelten Trägermaterials werden in eine Lösung von 1,5 g Kaliumhydroxyd in 80 ml Methanol eingerührt, das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand nochmals 2 Std auf 200° C erhitzt. Nach dem Erkalten verrührt man mit 3,2 g Apiezon L, welches in 60 ml Methylenchlorid gelöst wurde. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird auf 40—60 mesh gesiebt und vor Einfüllen in die Säule 1 Std im Vakuumofen auf 60° C erhitzt. Folgende Trennbedingungen werden für dieses Trägermaterial empfohlen: Säulenlänge 60 cm, Temperatur 175° bis 225° C. — 2. Chromosorb, 30—60 mesh, wird über Nacht mit Salzsäure (1:1) übergossen. Man wäscht mit Wasser säurefrei und trocknet über Nacht bei 150° C. 40 g des Trägermaterials werden 2,5 Std mit 200 ml 5%iger methanolischer Kalilauge behandelt und anschließend durch einen Glasfiltertiegel abgesaugt. Nach Waschen mit 200 ml frisch dest. Methanol und 100 ml Chloroform wird an der Luft getrocknet. Man rührt den Träger in eine Lösung von 20 g Dow-Corning High Vacuum Grease (nach den Angaben von F. R. Cropper und A. Heywood[2] gewaschen) in einer ausreichenden Menge Essigsäureäthylester ein, entfernt das Lösungsmittel langsam durch stetiges Bewegen und trocknet an der Luft. Vor Einfüllen in die Kolonne wird unter Überleiten von Stickstoff 3 Std auf 200° C erhitzt. Die von den Verff. empfohlene Säulenlänge beträgt 0,80—1,20 m, die Arbeitstemperatur 176° C. — Die quantitative Bestimmung der Amine erfolgt durch Bildung der Flächenprozente und Anwendung von durch Eichmessungen mit reinen Substanzen ermittelten Korrekturfaktoren. Letztere liegen für die C_8—C_{18}-Amine zwischen 0,946 und 1,126 ($F\ C_{16} \equiv 1{,}000$). — Die obigen stationären Phasen können auch mit Erfolg zur Trennung von gesätt. Fettalkoholen verwendet werden.

[1] J. Amer. Oil Chemists' Soc. **37**, 364—366 (1960). Archer-Daniels-Midland Co., Minneapolis, Minn., und Atlas Powder Co., Wilmington, Del. (USA). — [2] In: Vapour Phase Chromatography, London 1956, ed. by D. H. Desty, Academic Press, New York 1957. H. Garschagen

Die Bestimmung von Betainen und anderen quaternären Stickstoffverbindungen kann nach J. S. Wall, D. D. Christianson, R. J. Dimler und F. R. Senti[1] spektrophotometrisch nach Umwandlung in die Perjod-Derivate vorgenommen werden. Das Verfahren ist eine Modifikation der Cholinbestimmungsmethode nach H. D. Appleton, B. N. La Du jr., B. B. Levy, J. M. Steele und B. B. Brodie[2]. — *Arbeitsweise.* 0,5 ml Probe, die 10—100 μg in 1 n schwefel- oder 1—6 n salzsaurer Lösung enthalten können, kühlt man in Borosilicat-Zentrifugengläsern in kaltem Wasser von 0—4° C 10 min ab, gibt 0,2 ml kalte Jodjodkaliumlösung (15,7 g Jod + 20,0 g KJ in 100 ml, hergestellt nach[2]) zu, mischt und stellt 80 min ins kalte Wasser. Das Perjodid kristallisiert dann aus. Man zentrifugiert 5 min bei 4000 U/min. Der Überstand wird abgenommen, der Rückstand mit 5,0 oder 10,0 ml Äthylendichlorid versetzt und unter Rühren gelöst. Man mißt die Absorption bei 365 nm im Beckman-Spektrophotometer DU in 1,0 cm-Zellen. Es werden so *Carnitin, Betain, Trigonellin, γ-Butyrobetain, Stachydrin, Cholin, Tetramethylammonium* und *Thiamin* als Hydrochloride bestimmt. Die Genauigkeit beträgt $\pm$ 2 μg. Das Beersche Gesetz wird befolgt.

D. D. Christianson, J. S. Wall, R. J. Dimler und F. R. Senti[3] geben eine Methode zur *Abtrennung quaternärer Stickstoffverbindungen aus biologischem Material* an. Gemische aus *Carnitin, Chlorin, Betain, Trigonellin, Thiamin, γ-Butyrobetain, Stachydrin, N-Methylnicotinamid* und *Ergothionein* werden auf einer Ionenaustauschersäule getrennt und im Eluat nach der vorstehend beschriebenen Methode bestimmt. — *Arbeitsweise.* Dowex-50-W (200—400 mesh, 8% vernetzt) wird nach[4] vorbehandelt und mit 1 n Salzsäure in die H^+-Form gebracht. Die Aufschlämmung wird in eine Säule von 60 cm Länge und 3,2 cm innerem Durchmesser gegossen und mit 2 l des zuerst verwendeten Elutionsmittels gespült. Die 1 n salzsaure Lösung der zu trennenden Verbindungen wird aufgegeben. Dann eluiert man mit Salzsäure steigender Normalität (1,5, 2,5, 4,0, 6,0 n). Es werden Fraktionen zu je 10 ml, ab 4,0 n zu je 20 ml gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit soll 90 ml/Std betragen. Die untersuchten Verbindungen treten in folgender Reihenfolge aus: Carnitin, Betain, Cholin, γ-Butyrobetain, Stachydrin, N-Methylnicotinamid, Trigonellin und Ergothionein. Sie werden papierchromatographisch[5] identifiziert. Zur Bestimmung der einzelnen Verbindungen werden 0,5 ml des Eluats entnommen und wie oben angegeben analysiert. — Diese Abtrennungsmethode eignet sich besonders für die *Untersuchung von Getreideextrakten.* 200 g Getreide werden mit 2 l 80%igem Äthanol 10 min durchmischt. Man zentrifugiert und gießt den Überstand ab. Dasselbe wiederholt man mit 1 l und 500 ml Alkohol. Die vereinigten Extrakte werden im Vakuum eingedampft, auf 4° C abgekühlt und zur Entfernung von Lipiden und anderen wasserunlöslichen Substanzen zentrifugiert. Die klare Lösung wird weiter eingedampft und nochmals durch Zentrifugieren geklärt. Außer zahlreichen Aminosäuren findet man nach der Ionenaustauscherbehandlung im Getreideextrakt *Cholin, Trigonellin* und *Thiamin.*

[1] Analyt. Chemistry **32**, 870—874 (1960). Northern Regional Res. Lab., Peoria, Ill. (USA). — [2] J. biol. Chemistry **205**, 803 (1953); vgl. diese Z. **146**, 378 (1955). — [3] Analyt. Chemistry **32**, 874—878 (1960). Northern Reg. Res. Lab., Peoria, Ill. (USA). — [4] Wall, J. S.: Analyt. Chemistry **25**, 950 (1953); vgl. diese Z. **142**, 64 (1954). — [5] Block, R. J., E. E. Durrum u. G. Zweig: A Manual of Paper Chromatography and Electrophoresis, Acad. Press, New York, 1955. Margot Zimmermann

Die Basizität organisch substituierter Phosphine wird von C. A. Streuli[1] durch Titration in nichtwäßrigem Medium mit einem Glas-Kalomelelektrodenpaar unter Verwendung des Halbneutralisationspotentials bestimmt. Als Lösungsmittel dienen Methanol-Wassergemische verschiedener Zusammensetzung oder

Nitromethan. Aus den Messungen wird auf die p_K-Werte in Wasser extrapoliert. Die Versuche zeigen, daß die *tertiären Alkylphosphine* am stärksten basisch wirken (p_K etwa 8), während z. B. *Triphenylphosphin* nur noch den p_K-Wert 2,73 aufweist. Der Wasserstoff des Phosphins kann dabei auch durch 2 verschiedene Alkylgruppen ersetzt sein. Die Basenstärke nimmt über die *sekundären Phosphine* (p_K-Wert für *Dialkylphosphine* etwa 4) zu den *primären Phosphinen* ab (p_K-Wert nahezu 0).

[1] Analyt. Chemistry **32**, 985—987 (1960). American Cyanamid Co., Stamford, Conn. (USA). G. Denk

In einer zusammenfassenden Übersicht über die Charakterisierung und Bestimmung von Säuren und Säureanhydriden berichtet S. Veibel[1] über die *Bestimmung der Carboxylsäuren*. Für Säuren mit einer Carboxylgruppe ist das Äquivalentgewicht bei der *alkalimetrischen Titration* durch die Formel $\ddot{A} = a \cdot 1000/b \cdot n$ gegeben, wenn a g Substanz, b ml Natronlauge der Normalität n verbraucht haben. Bestimmungsmethoden werden für die verschiedenartigsten organischen Säuren beschrieben. Für die *Aminosäurebestimmung* wird unter anderem auf die *Formoltitration* nach S. P. L. Sørensen hingewiesen. Auch *mit Salzen von Silber, Alkalien* oder *Erdalkalien* lassen sich Säuren bestimmen. Auch hierfür werden einfache Äquivalentformeln angegeben. Auch *mit Bromestern* besteht die Bestimmungsmöglichlichkeit der Carboxylgruppe. Zur Bestimmung von *Säureanhydriden* ist die Alkalimetrie allgemein brauchbar. Unter Bezug auf die Literatur werden auch andere Methoden aufgeführt. Zum Schluß sind die Bestimmungsmethoden für *Ester* erwähnt. Zur Berechnung des Äquivalentgewichtes ist wieder obige Formel zu verwenden. Bei einem Ester RCOOR′ findet man $R + R' = \ddot{A} - 44$. Meist läßt sich daraus auch die Gesamtzahl der Kohlenstoffatome (m) berechnen nach der Gleichung $m = 1 + (\ddot{A} - 44)/14$, worin 14 das Molekulargewicht von CH_2 bedeutet. Bei Gegenwart von Hydroxyl- oder Carbonylgruppen muß man für diese den berechneten Wert m um je 1 vermindern.

[1] Chim. analytique **41**, 49—53 (1959). Techn. Univ. Kopenhagen (Dänemark). B. Rossmann

Nachweis und Bestimmung von Tetrachlorkohlenstoff gelingt nach P. Blanc, Godfrain und R. Lescure[1] durch Reaktion mit Thymol und Kupferpulver in alkalischer Lösung, wobei eine rosa Färbung entsteht. Die Reaktion ist spezifisch, andere chlorierte Kohlenwasserstoffe geben nur eine blaßgelbe Färbung. — *Ausführung.* 2 ml einer Mischung aus 100 ml Natronlauge von 36° Bé (D 1,33) und 10 ml 5%iger Kupfersulfatlösung überschichtet man mit 2 ml einer Lösung von 5 g krist. Thymol in 100 ml 95%igem Alkohol und mit 1 ml der alkolischen Probelösung. Das Pyrexreagensglas verschließt man mit einem Rückflußkühler, stellt es 5 min in siedendes Wasser und kühlt dann rasch unter fließendem Wasser ab. Enthält die Probelösung CCl_4, so färbt sich die Alkoholschicht rosa. Eine Blindprobe mit den Reagentien muß farblos bleiben. Durch Vergleich mit Lösungen bekannten Gehalts (40—320 mg CCl_4/l) läßt sich eine colorimetrische Halbmikrobestimmung durchführen.

[1] Chim. analytique **41**, 54—55 (1959). G. Denk

Zur densimetrischen und refraktometrischen Bestimmung von Zucker und Zuckerlösungen nach den Official Methods of Analysis AOAC (Methode 29-9) schlägt C. F. Snyder[1] einige Änderungen vor. So wird empfohlen, die Trocknung bei 100° C auf 2—3 Std zu verkürzen und nach der Wägung noch 1 Std nachzutrocknen. Bei kristallinem Zucker kann die Temperatur auf 105—110° C erhöht werden.

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **43**, 649—650 (1960). National Bureau of Standards, Washington 25, D.C. (USA). G. Kainz

Die gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung aromatischer Amine, die im Industrielaboratorium durchgeführt werden, bespricht R. GOUPIL[1] und gibt gleichzeitig Arbeitsvorschriften der Verfahren bekannt, die von ihm ausprobiert wurden. — 1. Bei der *Acidimetrie* können die in Wasser unlöslichen Amine in Mischungen aus Wasser und Alkohol oder Aceton oder in wasserfreiem Eisessig gelöst werden. Als Indicator dient Methylrot oder ein Mischindicator aus Methylrot und Bromkresolpurpur. Bei stark gefärbten Lösungen bewährt sich die potentiometrische Endpunktsanzeige. Die Lösung von 0,4 g des Amins in 100 ml Eisessig titriert man potentiometrisch mit 0,1 n Perchlorsäure (gelöst in Eisessig) unter Verwendung einer Antimon- und einer Kalomelelektrode. Durch einige Tropfen einer 0,03%igen Lösung von Kresolrot in Eisessig wird die Feststellung des herannahenden Endpunktes erleichtert. — 2. Bei der *Acetylierung mit Essigsäureanhydrid* und Pyridin wird das nicht verbrauchte Anhydrid nach der Hydrolyse alkalimetrisch bestimmt. Die Lösung des Amins in einer Mischung aus 1 Teil Essigsäureanhydrid und 3 Teilen Pyridin erhitzt man am Rückflußkühler auf 120° C und titriert dann mit 0,1 n Natronlauge gegen Phenolphthalein oder besser gegen einen Mischindicator aus 1 Teil einer 0,1%igen Lösung von Kresolrot und 3 Teilen einer 0,1%igen Lösung von Thymolblau. — 3. Da sich beim *Diazotieren und Kuppeln* die einzelnen Amine recht verschieden verhalten, kann keine allgemein gültige Arbeitsvorschrift gegeben werden. In vielen Fällen haben sich die folgenden 2 Arbeitsweisen bewährt: Man löst 0,05 Mol des Amins in 55 ml 1 n Salzsäure, kühlt auf 5—10° C ab, gibt 500 ml Wasser und 50 ml Salzsäure (D 1,16) hinzu und titriert langsam mit 0,1 n $NaNO_2$-Lösung. Als Indicator dient Jodstärkepapier. Manchmal ist es nötig, auf 25—30° C zu erwärmen oder die Reaktion mit KBr zu aktivieren. Sind auch saure Gruppen im Amin vorhanden, so löst man 0,05 Mol in Wasser, gibt für jede saure Gruppe 55 ml 1 n Na_2CO_3-Lösung hinzu, kühlt auf 5—10° C ab, verdünnt auf 500 ml, gibt etwa 95% der notwendigen Nitritmenge hinzu und in einem Guß 50 ml Salzsäure (D 1,16) und titriert nach einigen Minuten zu Ende. Man kann auch einen Überschuß an Nitrit hinzufügen und mit p-Nitranilin zurücktitrieren. — 4. Wenn gefärbte Lösungen entstehen, empfiehlt sich auch die *Dead stop-Titration.* Man versetzt die Lösung von 0,01—0,005 Mol mit 5 ml Salzsäure (D 1,19) und 25 ml 20%iger KBr-Lösung und verdünnt auf 90—100 ml. Saure Gruppen werden vorher durch überschüssige Natronlauge neutralisiert. Dann gibt man Natriumnitritlösung hinzu und titriert mit p-Nitranilin oder p-Toluidin zurück. — 5. *Nach der Reaktion von* SANDMEYER versetzt man die Lösung von 0,05 Mol des Amins mit 50 ml Salzsäure (D 1,19) und verdünnt zum Liter. Zu 5—10 ml davon gibt man 5 ml Katalysatormischung (siehe unten) und 10—20 ml 0,1 n Nitritlösung, erhitzt nach 5 min und mißt den entwickelten Stickstoff. Andere Verfahren, wie die Bestimmung nach KJELDAHL, nach ZIMMERMANN und KIRSTEN, durch Bromieren, mit Chloramin, durch Colorimetrie und Chromatographie werden nur kurz erwähnt. — Zur *Darstellung eines aktiven Kupferkatalysators* löst man 3 g Kupferchlorid in 50 ml Salzsäure (D 1,19) und läßt langsam 50 ml Schwefelsäure (D 1,84) zufließen. Der Katalysator soll täglich frisch bereitet werden.

[1] Chim. analytique **42**, 300—307 (1960). Compagnie Française des Matières Colorantes. G. DENK

Über die verteilungschromatographische Trennung von Benzoesäure, m-Hydroxybenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure und Salicylsäure sowie ihre anschließende UV-spektrophotometrische Bestimmung berichtet H. C. VAN DAME[1]. — *Herstellung der Säule.* 10,0 g Kieselsäure (100 mesh „zur Chromatographie") werden mit 6,5 ml 1 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung bis zur Homogenisierung verrührt und dann mit Benzol in eine Kolonne eingeschlämmt. Die Säulenfüllung muß

immer mit etwas Lösungsmittel bedeckt sein. — *Arbeitsweise.* Die trockenen Natriumsalze der obigen Säuren (z. B. aus Extrakten von *Lebensmitteln*) werden in einem Becherglas mit 1 ml 4 n Schwefelsäure gemischt und anschließend mit 2,00 g Kieselsäure gut verrührt. Die Mischung wird unter Zugabe von Benzol quantitativ auf die Säule übergeführt (insgesamt 5 ml Volumen) und mit Benzol eluiert (2—3 ml/min), wobei Fraktionen von je 25 ml aufgefangen werden. Nachdem 50 ml abgelaufen sind, eluiert man mit einem Benzol-Butanolgemisch (95:5) und nach weiteren 100 ml mit Benzol-Butanol (85:15). Die einzelnen Fraktionen werden mit 0,01 n Natronlauge titriert, nachdem einige Tropfen Kresolrotlösung (50 mg in 100 ml Wasser und 1,3 ml n Natronlauge) sowie 10 ml CO_2-freies Wasser (gegen Kresolrot bis zur Rotfärbung titriert) zugegeben wurden. Gewöhnlich enthalten die Fraktionen 2 und 3 Benzoesäure, 4 und 5 m-Hydroxybenzoesäure + p-Hydroxybenzoesäure und die Fraktionen 6 und 7 Salicylsäure. Aus dem Natronlaugeverbrauch können die Gehalte an Benzoesäure und Salicylsäure berechnet werden, zur Kontrolle nimmt man jedoch noch eine anschließende photometrische Bestimmung vor, nachdem man die entsprechenden Fraktionen vereinigt und auf dem Wasserbad eingedampft hat. — *UV-spektrophotometrische Bestimmung. Benzoesäure.* Der Rückstand der Benzoesäurefraktionen wird in 0,1 n Salzsäure gelöst und so verdünnt, daß in 100 ml etwa 5 mg Säure enthalten sind. 20 ml dieser Lösung werden nochmals auf 100 ml verdünnt und diese Lösung mit etwa 1 mg/100 ml bei 230 nm gegen 0,1 n Salzsäure photometriert. Die Auswertung erfolgt an Hand einer Lösung von 1 mg Benzoesäure in 100 ml 0,1 n Salzsäure. Zur Identifizierung überprüft man die Lage der Absorptionsmaxima bei 230 und 275 nm sowie der Absorptionsminima bei 260 und 210 nm. — *m-Hydroxybenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure.* Man löst in 0,1 n Salzsäure zu etwa 5 mg Gesamtsäure in 100 ml und bestimmt in dieser Lösung m-Hydroxybenzoesäure bei 295 nm (bei dieser Wellenlänge absorbiert die p-Hydroxybenzoesäure nicht); die Auswertung erfolgt mit einer entsprechenden Standardlösung. Man verdünnt einen anderen Teil auf etwa 1 mg/100 ml und bestimmt die Absorption bei 255 nm. Die Berechnung des Gehaltes an p-Hydroxybenzoesäure erfolgt mit einer Vergleichslösung, welche in 100 ml 0,1 n Salzsäure 1 mg p-Hydroxybenzoesäure und so viel m-Hydroxybenzoesäure enthält, wie durch die Messung bei 295 nm ermittelt worden ist (Umrechnung auf 1 mg!). Die zur Identifizierung geeigneten Absorptionsmaxima betragen 295, 235 und 209 nm für m-Hydroxybenzoesäure sowie 255 nm für p-Hydroxybenzoesäure. — *Salicylsäure.* Man stellt wie vor durch Verdünnung eine Konzentration von etwa 5 und 1 mg in 100 ml 0,1 n Salzsäure her und bestimmt die Salicylsäure mit Hilfe der Absorptionen bei 235 nm (1 mg/100 ml) und 302 nm (5 mg/100 ml). Die zur Identifizierung geeigneten Absorptionsmaxima und -minima liegen bei 208, 235 und 302 bzw. 260 und 219 nm.

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **43**, 593—594 (1960). Food and Drug Admin., Dep. Health, Education, and Welfare, Buffalo, N.Y. (USA). H. Garschagen

IV. Spezielle analytische Methoden

3. Analysenmethoden auf dem Gebiete der Pharmazie

Über die papierchromatographische Reinheitsprüfung von Undecylensäure und den Nachweis von Undecylensäure in Arzneimittelzubereitungen berichtet F. Klinkhammer[1]. Mit dem Fließmittel n-Butanol-Ammoniak (3:1) erhält man beim Chromatographieren von etwa 40 μg Substanz auf Schl. & Sch.-Papier Nr. 2043 b MGl eine gute Auftrennung von Undecylen- (R_f-Wert etwa 0,7) und

Sebacinsäure (R_f-Wert etwa 0,18). Das Sichtbarmachen der Flecken erfolgt am besten durch leichtes Besprühen des Chromatogramms mit Eisen(III)-chloridlösung (0,14 g $FeCl_3$/100 ml Wasser) und unmittelbar anschließendes Besprühen mit 1%iger wäßriger Kaliumhexacyanoferrat(II)-lösung, wobei weiße Flecken auf blauem Untergrund erscheinen, die nach dem Trocknen beständig sind. — Zum *Nachweis von Oenanthol in Undecylsäure* wird ein weiteres Chromatogramm angefertigt, indem man etwa 40 µg Probe mit n-Butanol-Eisessig (3:1) entwickelt und mit Fuchsin-Schwefligsäurereagens[2] besprüht (20 mg Fuchsin werden in Wasser gelöst und mit Natriumhydrogensulfit bis zur Entfärbung versetzt. Nach Filtration gibt man einige Tropfen verd. Salzsäure zu; die Lösung muß immer frisch angesetzt werden). Bei einem R_f-Wert von etwa 0,95 erscheint Oenanthol als blauroter Flecken auf rosa Untergrund. Der Aldehyd kann auch im UV-Licht mit Hilfe seiner Fluorescenz gut identifiziert werden. — Zum *Nachweis von Undecylensäure in Puder, Salben und Seifen* wird einige Zeit mit warmem Petroläther extrahiert und der Extrakt wie vorstehend untersucht. — Die vom Verf. entwickelten Prüfverfahren haben den Vorteil, daß das sonst übliche umständliche Imprägnieren des Chromatographiepapiers[3] mit Petroleum entfällt.

[1] Pharmazie **15**, 390—393 (1960). Wissenschaftliche Abt. Arzneimittelfabrik Hüls, Dr. Albin Hense, Hüls bei Krefeld. — [2] Fries, J., A. Holasek u. H. Lieb: Mikrochim. Acta (Wien), **1956**, 1722; vgl. diese Z. **157**, 44 (1957). — [3] Kaufmann, H. P., u. W. H. Nitsch: Fette u. Seifen **56**, 154 (1954); **58**, 234 (1956); vgl. diese Z. **146**, 115 (1955); **157**, 450 (1957). H. Garschagen

N-substituierte Phenothiazinderivate können nach J. Budínský, R. Zahradník und M. Chvapil[1] in pharmazeutischen Zubereitungen sowie in biologischem Material auf Grund ihrer UV-Absorption bestimmt werden. Die Verbindungen besitzen in wäßriger oder ätherischer Lösung in den Wellenlängenbereichen 250 bis 260 nm sowie 295—310 nm Absorptionsmaxima. Das Beersche Gesetz ist in weiten Konzentrationsbereichen erfüllt, z. B. für *Chlorpromazin* (Lactargil) bei 253 nm im Bereich $0-3\cdot10^{-5}$ m, bei 300 nm im Bereich $0-10^{-4}$ m. Man kann noch 0,3 µg/1 ml zuverlässig bestimmen. Das Verfahren ist also etwa 30mal empfindlicher als die übliche colorimetrische Bestimmung auf Grund der Farbreaktion mit Schwefelsäure. Um Störungen durch Begleitstoffe nach Möglichkeit zu vermeiden, führt man die Bestimmungen in ätherischen Extrakten aus. Aber auch in diese gehen aus biologischem Material (Blut, Harn, Fruchtwasser) wechselnde Mengen störender Stoffe über, so daß Vergleichsuntersuchungen der Materialien vor Applikation der Phenothiazine notwendig sind. — *Ausführung.* Man schüttelt 5 ml der biologischen Flüssigkeit mit 5 ml eisgekühltem Äther, der 0,1 ml 30%ige Natronlauge enthält, und mißt die Absorption der ätherischen Lösung in geschlossenen Küvetten bei 253 nm gegen reinen Äther.

[1] Československ. Farmac. **9**, 299—303 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) I. Gynäkol. Klinik d. Univ. u. Inst. f. Arbeitshygiene u. Berufskrankh., Prag (ČSSR). Z. Stejskal

Zur Bestimmung von 1-(p-Bromphenyl)-1-phenyläthanol und 1,1-Diphenyläthanol haben B. Buděšínský und M. Aixnerová[1] eine neue Methode ausgearbeitet, bei der die durch Dehydrierung entstehenden Äthylenderivate bromometrisch bestimmt werden. Die Dehydrierung kann durch Erwärmen mit verd. Schwefelsäure, mit Pyridin und Acetanhydrid oder nur durch Erwärmen der wäßrigen Lösung durchgeführt werden. Folgender *Arbeitsvorgang* hat sich am besten bewährt: 10 ml des Gemisches von Pyridin und Acetanhydrid (3:1) werden mit 1,0—2,0 mg-Äquivalent der Probe 90 min unter dem Rückflußkühler gekocht.

Nach dem Abkühlen wird der Kühler mit 10 ml Chloroform durchgespült und zum Reaktionsgemisch werden genau 25 ml 0,1 n Bromlösung in Eisessig zugegeben. Der Kolben wird zugestöpselt und 5 min im Dunkeln stehen gelassen. Dann setzt man 1 g Kaliumjodid, 10 ml 20%ige Schwefelsäure und 50 ml redest. Wasser zu und titriert das ausgeschiedene Jod mit 0,1 n Natriumthiosulfatlösung. Gleichzeitig wird ein Blindversuch durchgeführt. 1 ml 0,1 n $Na_2S_2O_3$-Lösung entspricht 13,858 mg 1-(p-Bromphenyl)-1-Phenyläthanol oder 9,714 mg 1,1-Diphenyläthanol. Wenn die Probe ein Äthylenderivat enthält, muß dieses erst ohne Dehydrierung bromometrisch bestimmt werden. Anwesenheit von Acetophenon oder Bromacetophenon in technischen Produkten stört die Bestimmung nicht.

[1] Českoslov. Farmac. **9**, 312—323 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Forsch.inst. f. Pharmaz. und Biochem. Prag. Z. Stejskal

Zur Bestimmung von β-Naphthoxyäthanol haben F. Buben und F. Jančík[1] eine bromometrische Methode ausgearbeitet. Unter den Aciditätsbedingungen der Arbeitsvorschrift führt die Reaktion zu dem Monobromderivat α-Brom-β-Naphthoxyäthanol, das als Acetat isoliert werden konnte. Bei höherer Acidität bildet sich in steigendem Maße das Dibromderivat. — *Ausführung.* Man löst 150 mg Probe in 25 ml Eisessig, gibt 1 ml konz. Salzsäure und 1 g Kaliumbromid zu und titriert unter potentiometrischer Kontrolle mit 0,1 n Kaliumbromatlösung. Das Potential wird auch in der Nähe des Äquivalenzpunktes sehr schnell konstant, der Potentialsprung beträgt 350—400 mV/0,03 ml 0,1 n $KBrO_3$. 1 ml 0,1 n $KBrO_3$-Lösung entspricht 9,4113 mg β-Naphthoxyäthanol. Die Analysenfehler sind nicht größer als ± 0,3%. — Bestimmung von *β-Naphthoxyäthanol in Anwesenheit von 5-Allyl-5-cyclohexenyl-2-thiobarbitursäure im Präparat Anavenol.* 1 m Anavenol wird mit 20 ml Wasser und 2 ml 2 n Natronlauge versetzt und nacheinander mit 15, 10, 10, 10 und 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Extrakten wird das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand wird in 25 ml Eisessig gelöst und wie beschrieben weiterbehandelt. Das Barbiturat wird aus saurem Medium in Chloroform ausgeschüttelt und nach dem Abdampfen gravimetrisch bestimmt.

[1] Českoslov. Farmac. **9**, 307—309 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Forsch.-inst. f. Pharmaz. u. Biochem. Prag. Z. Stejskal

Die Bestimmung von Sulfonamiden (SA) durch *photometrische Titration* beschreiben Y. Tanase und S. Shimomura[1]. Das Verfahren beruht auf der Überführung der SA in ihre Diazoniumsalze durch Einwirkung von salpetriger Säure in saurer Lösung. Nitrition zeigt ein UV-Absorptionsmaximum bei 355 nm, während die Diazoniumsalze von *Sulfanilamid* und *Sulfacetamid* bei dieser Wellenlänge keine Eigenabsorption besitzen. Sie können also auf folgende Weise ermittelt werden: Man stellt das Spektrophotomter auf die genannte Wellenlänge ein, gibt tropfenweise gesätt. Natriumnitritlösung zu und mißt nach jedem Zusatz die Absorption. Sie nimmt zunächst nur wenig zu, vom Äquivalenzpunkt an findet dann ein steiler Anstieg statt. Die Titrationskurve besteht also aus 2 Geraden, die sich im Äquivalenzpunkt schneiden. — Die Diazoniumsalze von *Sulfathiazol*(I), *Sulfaguanidin*(II), *Sulfadiazin*(III) und *Sulfamerazin*(IV) besitzen dagegen bei 355 nm Eigenadsorption, die störend wirkt. Die Verff. haben deshalb bei der auf gleiche Weise erfolgenden Titration dieser SA in Vorversuchen über den gesamten UV-Bereich die Absorptionskurven aufgenommen und zwar vor Zugabe von Natriumnitrit, beim halben Reaktionsumsatz, beim Äquivalenzpunkt und nach Zusatz eines $NaNO_2$-Überschusses. Aus den auf einem Diagramm aufgetragenen UV-Absorptionskurven haben sie je 2 Wellenlängen ausgewählt, bei denen bis zum Äquivalenzpunkt ein linearer Anstieg der Absorption erfolgt, die sich dann bei

Nitritüberschuß nicht mehr wesentlich ändert. Die Titrationskurven bestehen hier wieder aus 2 Geraden, die sich im Äquivalenzpunkt schneiden, doch steigt die Gerade vor Erreichen des Äquivalenzpunktes mehr oder weniger steil an, vom Äquivalenzpunkt an verläuft sie praktisch parallel zur Reagensachse. Die geeigneten Wellenlängen sind bei I 265 und 325 nm, bei II 270 und 295 nm, bei III 262 und 305 nm und bei IV 262 und 300 nm. Das Original enthält die Titrationskurven der genannten SA, die UV-Absorptionskurven von I bis IV und eine Wertetabelle.

[1] J. pharmac. Soc. Japan **80**, 516—519 (1960) [Japanisch]. (Nach engl. Zus.fass. ref.) Fac. Pharmac., Tokushima Univ. (Japan). K. Söllner

Über die oxydimetrische Bestimmung von 1,4-Dihydrazinophthalazin berichten F. Jančík, B. Buděšínský und J. Körbl[1]. Die Bestimmungen können mit Bromat-Bromid in salzsaurer Lösung potentiometrisch oder jodometrisch, mit Dichromat in stark schwefelsaurer Lösung jodometrisch durchgeführt werden. Andere ebenfalls untersuchte Oxydationsmittel (KJO_3, $KMnO_4$, $Ce(SO_4)_2$, J_2) erwiesen sich als ungeeignet. — *Ausführung.* Zur potentiometrischen Bestimmung mit Bromat löst man 0,3—0,5 mMol 1,4-Dihydrazinophthalazin in 20 ml 4 n Salzsäure, gibt 3 g Kaliumbromid zu und titriert die Lösung mit 0,1 n Kaliumbromatlösung unter potentiometrischer Kontrolle. Zur jodometrischen Bestimmung versetzt man die salzsaure Lösung nach KBr-Zusatz mit 25 ml 0,1 n $KBrO_3$-Lösung, gibt 1 g Kaliumjodid zu und bestimmt den Bromatüberschuß mit 0,1 n Thiosulfatlösung. Zur Bestimmung mit Dichromat löst man dieselbe Menge der Probe in 25 ml 10 n Schwefelsäure, setzt 25 ml 0,1 n $K_2Cr_2O_7$-Lösung zu, verdünnt nach 15 min mit etwa 100 ml Wasser, gibt 1 g Kaliumjodid zu und titriert mit 0,1 n Thiosulfatlösung. 1 ml der 0,1 n Oxydationslösungen entspricht 3,289 mg wasserfreiem Dichlorid oder 3,604 mg wasserfreiem Sulfat von 1,4-Dihydrazinophthalazin.

[1] Československ. Farmac. **9**, 304—307 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Forsch.-inst. f. Pharmaz. u. Biochem. Prag. Z. Stejskal

Zur maßanalytischen Bestimmung des Antirheumamittels 1,2-Diphenylpyrazolidin-3,5-dion(I) und seiner Derivate *4-(γ-Chlorkrotyl-1,2-diphenylpyrazolidin-3,5-dion*(II) und *4-(γ-Ketobutyl)-1,2-diphenylpyrazolidin-3,5-dion*(III) eignet sich nach M. Konupčík, F. Kupčík und M. Liška[1] ein bereits früher beschriebenes bromometrisches Verfahren[2]. Außerdem werden folgende 2 acidimetrische Arbeitsweisen beschrieben: *Titration mit Natriummethylat.* Man löst 0,2—0,3 g Probe in 20 ml vorher neutralisiertem Chloroform oder Dioxan und titriert mit 0,05 n wasserfreier Natriummethylatlösung gegen Phenolphthalein als Indicator. 1 ml der Maßlösung entspricht 12,610 mg I, 17,040 mg II, bzw. 16,118 mg III. Die Standardabweichungen betragen etwa $\pm$ 0,15%. — *Titration mit Natronlauge.* Man löst 0,4—0,5 g Probe in 25 ml Dioxan und titriert mit 0,1 n Natronlauge gegen Phenolphthalein. Die Äquivalenzverhältnisse entsprechen den obigen. Die Standardabweichung wird mit 0,05% angegeben.

Nach einer weiteren Mitteilung von M. Konupčík, F. Kupčík und M. Liška[3] können die Verbindungen I, II und III voneinander papierchromatographisch getrennt werden. Dazu werden 50—100 μg des Stoffgemisches (in Chloroform gelöst) auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen. Hierauf wird das Papier mit äthanolischer Formamidlösung (1:1) imprägniert, die 5% kristallisiertes Ammoniumformiat enthält. Man beläßt das imprägnierte Papier 10 min an der Luft und chromatographiert dann absteigend mit Benzol-Cyclohexan (8:2) oder (6:4). Nach 3 Std wird das Chromatogramm im Vakuum bei 50° C getrocknet und mit frisch bereitetem Gemisch von 15%iger Eisen(III)-chloridlösung und 1%iger

Kaliumhexacyanoferrat(III)-lösung (1:1) entwickelt. I, II und III können auf diese Art auch von 4-Butyl-1,2-diphenylpyrazolidin-3,5-dion (Butazolidin) getrennt werden.

[1] Československ. Farmac. **9**, 236—238 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) VEB Farmakon, Olmütz (ČSSR). — [2] Jančík, F., E. Kraus, B. Buděšínský u. O. Činková: Československ. Farmac. **6**, 105 (1958); vgl. diese Z. **161**, 399 (1958). — [3] Československ. Farmac. **9**, 239—241 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Z. Stejskal

4-Aminoantipyrin und 4-Formylaminoantipyrin in Pyramidon (Amidopyrin) bestimmt J. Gasparič[1] colorimetrisch auf Grund der Diazotierung und Kupplung mit Phenyl-I-säure. Der entstehende rote Farbstoff hat bei ungefähr 490 nm ein Absorptionsmaximum. Im Konzentrationsbereich von 0—200 μg Aminoantipyrin in 50 ml Lösung ist die Farbintensität linear abhängig von der Konzentration. Formylaminoantipyrin reagiert zunächst nicht, bei der Verseifung mit verd. Salzsäure (30 min auf siedendem Wasserbade) liefert es aber eine entsprechende Menge 4-Aminoantipyrin, die dann bestimmt werden kann. Um also beide Stoffe nebeneinander in Pyramidon zu bestimmen, mißt man einmal ohne Verseifung, das andere Mal nach vollendeter Verseifung. Die Methode gestattet, beide Verunreinigungen in Pyramidon in Konzentrationen von einigen Tausendstel Prozent auf $\pm$ 3—5% genau zu erfassen. — *Lösung der Phenyl-I-säure.* Man versetzt eine eisgekühlte Lösung von 6,0 g wasserfreiem Natriumcarbonat in etwa 80 ml Wasser mit 100 mg nach Report Fiat[2] gereinigter Phenyl-I-säure und füllt mit Wasser auf 100 ml auf. Die Lösung ist auch bei 0—5° C nicht stabil und muß deshalb jeweils frisch bereitet werden. — *Aufstellung der Eichkurve.* 0,5—5,0 ml der Standardlösung (20 mg 4-Aminoantipyrin in 500 ml Wasser) werden in eine Serie von 50 ml-Meßkolben pipettiert und mit 10 ml 8%iger Pyramidonlösung in 0,4 n Salzsäure versetzt. Nach Abkühlung auf 0—5° C setzt man 2 ml 2%ige Natriumnitritlösung zu und läßt 5 min in Eis stehen. Dann gibt man 10 ml Phenyl-I-säurelösung zu und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Gleichzeitig wird ein Blindversuch durchgeführt. Die Farbintensität wird nach 10—15 min unter Verwendung des Grünfilters VG 9 (Lange-Colorimeter) gegen Wasser gemessen.

[1] Československ. Farmac. **9**, 241—243 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Forsch.-inst. f. organ. Synthesen, Pardubice-Rybitví (ČSSR). — [2] Report FIAT Nr. 1313, Bd. 2, 403. Z. Stejskal

Zur polarographischen Bestimmung von Acetophenon in Injektionslösungen von Lobelinhydrochlorid empfiehlt L. Miczko[1] die Arbeitsweise von Šantavý[2]: 1 ml der 1%igen Injektionslösung wird mit Britton-Robinson-Puffer p_H 6,5 auf das Volumen von 100 ml aufgefüllt und 10 ml dieser Lösung werden in das polarographische Gefäß pipettiert. Nach mindestens 3minütigem Durchleiten von Stickstoff wird polarographiert. Die Empfindlichkeit 1:10 hat sich gut bewährt. Es ist möglich, Gehalte von 0,5—0,8% Acetophenon zu bestimmen.

[1] Československ. Farmac. **9**, 314—315 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Militärabt. Bystřice pod Hostýnem (ČSSR). — [2] Březina-Zuman: Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie, Akad. Verlagsges., Leipzig 1956. Z. Stejskal

Zur Identifizierung von Stilboestrol-diphosphat neben dem Monophosphat, freiem Stilboestrol und anorganischem Phosphat in pharmazeutischem Zubereitungen [*Difostilben (SPOFA), Honvan, Cytonal*] haben K. Macek und S. Vaněček[1] papierchromatographische Verfahren ausgearbeitet. — *Ausführung.* a) *Stilboestrol-*

phosphate. 200 μg Probe (in wäßriger Lösung) werden auf Whatman-Papier Nr. 2 aufgetragen und im System n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4 : 1 : 5) absteigend chromatographiert. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel wird das Chromatogramm mit Formamidlösung besprüht, 30 min auf 105° C im Trockenschrank erwärmt und dann mit dem frisch hergestellten 1 : 1-Gemisch von 15%iger Eisen(III)-chloridlösung und 1%iger Kaliumhexacyanoferrat(III)-lösung besprüht. Der Reagensüberschuß wird sofort mit schwach angesäuertem Wasser (HCl) abgewaschen. Die Stilboestrolphosphate werden als blaue Flecken sichtbar (R_f-Werte: Diphosphat 0,32, Monophosphat 0,76, Stilboestrol 0,95). — b) *Stilboestrol.* 200 μg Probe (in äthanolischer Lösung) werden mit 0,2—0,5—1 μg Stilboestrolstandard auf Whatman-Papier Nr. 4 aufgetragen. Das Papier wird dann mit 50%iger äthanolischer Formamidlösung imprägniert. Nach 15 min chromatographiert man mit Chloroform als Lösungsmittel. Die Sichtbarmachung erfolgt wie oben. Stilboestrol erscheint bei R_f 0,50, die Phosphate bleiben am Startpunkt. — c) *Anorganisches Phosphat.* 500 μg der Probe und 0,5—1—2,5 μg Orthophosphorsäure werden aufgetragen und mit dem Lösungsmittelsystem n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4 : 1 : 5) entwickelt. Zur Sichtbarmachung wird mit Ammoniummolybdatlösung (5 ml 60%ige Perchlorsäure + 10 ml n Salzsäure + 25 ml 4%iges Ammoniummolybdat + Wasser zu 100 ml) besprüht und nach dem Trocknen bei 85° C (etwa 10 min) mit 5%iger Ascorbinsäurelösung besprüht. Das anorganische Phosphat erscheint als intensiv blauer Flecken mit R_f 0,09. — Mit dem beschriebenen Arbeitsvorgang kann man in Stilboestroldiphosphat noch 0,04% anorganisches Phosphat, 1% Monophosphat und 0,1% Stilboestrol nachweisen.

[1] Československ. Farmac. **9**, 309—311 (1960) [Tschechisch]. (Mit russ., engl. u. dtsch. Zus.fass.) Forsch.-inst. f. Pharmaz. u. Biochem. Prag. Z. Stejskal

Die Bestimmung der Nordihydroguajaretsäure in ölhaltigen Vitaminpräparaten nimmt A. Engelund[1] in Anlehnung an das Verfahren von K. F. Gander[2] vor. Es wird papierchromatographisch absteigend mit einer 2,5%igen Lösung von Acetessigsäureäthylester in Wasser als Fließmittel gearbeitet (Laufzeit 2 Std). Nach dem Trocknen wird mit alkoholischer Silbernitratlösung besprüht, erneut getrocknet und dann mit Ammoniak besprüht. Nordihydroguajaretsäure erscheint als brauner Fleck mit einem R_f-Wert von 0,3. Mit Hilfe von durchsichtigem Millimeterpapier wird der Fleck vermessen und die Menge auf Grund der Proportionalität zwischen Fleckengröße und dem Logarithmus der Substanzmenge errechnet. Die auf das Papier aufgetragene Lösung muß frei sein von fettigem Material. Dies wird auf folgende Weise erreicht: Eine Tablettenmasse, die drei Tabletten entspricht, wird mit 1 ml 63%igen Alkohol versetzt. Das Gemisch wird auf dem Wasserbad erhitzt, bis das Fett geschmolzen ist, und dann geschüttelt. Diese Prozedur wird mehrmals wiederholt. Man läßt kurze Zeit bei 4° C stehen, filtriert und verwendet einen Teil des Filtrats für die Papierchromatographie.

[1] Pharmac. Acta Helvetiae **35**, 284—291 (1960). Apothekerforenings Kontrollab., Kopenhagen (Dänemark). — [2] Fette u. Seifen **57**, 423 (1955); vgl. diese Z. **150**, 399 (1956); **157**, 135 (1957). L. Acker

4. Analyse von biologischem Material

Über die Analyse des Magnesiumgehaltes von Myosin B berichten W. J. Bowen und H. L. Martin[1]. Da man bei der trocknen Veraschung von Myosin B zu niedrige Magnesiumwerte erhält[2], die wahrscheinlich durch das Auftreten von sehr schwer löslichem Magnesiumpyrophosphat bedingt sind, wenden Verff. jetzt die nasse

Veraschung an: 0,5 ml einer Lösung, die 15 mg Myosin/ml enthält, versetzt man mit 0,1 ml einer Mischung aus 6,5 Teilen konz. Salpetersäure und 3,5 Teilen 60%iger Perchlorsäure, trocknet im Ofen bei 110° C und erhitzt dann auf der Heizplatte bei 200—210° C, bis eine weiße Asche resultiert. Man löst in 0,5 ml 5%iger Trichloressigsäure, füllt mit Wasser auf 12,5 ml auf und bestimmt das Magnesium mit Chrome Fast Blue BG bei 556 nm nach W. J. Bowen und H. L. Martin[2], wobei Calcium nicht stört. Man erhält so Magnesiumwerte, die gut mit denen nach Denaturierung von Myosin B mit Trichloressigsäure oder besser Perchlorsäure übereinstimmen: 0,56 µg Mg/mg Myosin B. Dialysierversuche zeigen, daß Äthylendiamintetraessigsäure das Magnesium nicht aus dem Myosin entfernt.

[1] Arch. Biochem. Biophysics **87**, 70—72 (1960). Nat. Inst. Arthritis Metabolic Diseases, Nat. Inst. Health, Bethesda, Md. (USA). — [2] Proc. Soc. exp. Biol. Med. **101**, 734 (1959). E. Müller, Würzburg

Spektroskopische Bestimmung von Calcium und Magnesium im Blut. J. B. Willis[1] führt *die Calciumbestimmung* unter Verwendung einer von G. F. Box und A. Walsh[2] entwickelten Apparatur durch. Die Ansaugdüse wird hier mit einer größeren Bohrung versehen, um ein Zusetzen zu verhindern. Man verdampft mit einer Acetylen-Luftflamme (4,35—5,4 l Luft/min, 0,9—1,6 l Acetylen/min), die in einem 10 cm langen Lundegardh-Brenner erzeugt wird. An Stelle von Acetylen kann auch Leuchtgas (3 l/min) verwendet werden. Die Serumproben (0,2—0,5 ml) werden für die *Routineanalyse* in einem 5 ml-Meßkolben mit 2,5 ml ÄDTA-Lösung (20000 ppm) versetzt, mit Wasser aufgefüllt und so zur Messung verwendet. Es kann auch nur mit Wasser (ohne ÄDTA) verdünnt werden. *Zur genaueren Bestimmung* wird das Serum enteiweißt: Man pipettiert 0,5 ml Serum in ein Zentrifugenglas, setzt 0,25 ml Strontiumchloridlösung (50000 ppm Sr) und 3,25 ml Wasser zu und dann — unter Rühren — 1,00 ml Trichloressigsäure. Nach 5 min zentrifugiert man 5 min und verwendet die überstehende Lösung zur Messung. Die Werte werden aus Eichkurven entnommen, die bei der Routinemethode mit Calciumlösungen aufgestellt werden, die 10000 ppm ÄDTA bzw. 300 ppm Na(NaCl) (bei Verdünnen nur mit Wasser), bei der anderen Methode Natriumchlorid (300 ppm Na), Strontiumchlorid (2500 ppm Sr) und 4% Trichloressigsäure enthalten. Die Störungen durch Natrium und Kalium im Blut betragen 2% und werden durch die Na-Zugabe im Standard eliminiert. Magnesium stört nicht, der Einfluß von Phosphat wird durch Zugabe des ÄDTA ausgeschaltet.

Die Magnesiumbestimmung im Blut nach J. B. Willis[3] entspricht der vorstehend beschriebenen Calciumbestimmung. Die Serumproben (man kann sie wegen der hohen Empfindlichkeit auf das 20fache verdünnen) werden in 5 ml-Meßkolben mit Wasser, das 10000 ppm ÄDTA enthält, verdünnt und so zur Messung verwendet. Die Werte werden aus Eichkurven abgelesen.

[1] Spectrochim. Acta **16**, 259—272 (1960). Div. of Chem. Phys., CSIRO, Melbourne (Australien). — [2] Spectrochim. Acta **16**, 255 (1960). — Jones, W. G., u. A. Walsh: Spectrochim. Acta **16**, 249 (1960). — [3] Spectrochim. Acta **16**, 273—278 (1960). Div. of Chem. Phys., CSIRO, Melbourne (Australien). Ursula Baumann

Calcium und Magnesium neben großen Mengen Phosphat in Rattenlebern bestimmen J. R. Dunstone, N. P. Madsen und H. R. Bell[1] auf Grund der von W. H. Horner[2] entwickelten Methode. — *Ausführung.* Man erhitzt 3—5 g Lebergewebe in einem Platintiegel über Nacht auf 700—800° C, nimmt die Asche in 1,0 ml 0,5 n Salpetersäure auf und entfernt zunächst das Phosphat. Dazu überführt man die Lösung nach einigem Stehen quantitativ (den Tiegel mit 1 ml Salpetersäure, dann 2mal mit 1 ml Wasser ausspritzen) in ein 15 ml-Zentrifugenglas und

gibt 2 ml 66%ige Natriumwolframatlösung ($Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$) und 4 ml 28%ige Morpholinnitratlösung zu. Nach 1 Std zentrifugiert man den Niederschlag bei 3000 U/min 15 min ab. *Zur Calciumbestimmung* titriert man zunächst 1,0 ml der überstehenden Lösung (A) mit 4 n Natronlauge gegen Alizaringelb G, um zu ermitteln, wieviel Natronlauge gebraucht wird, um die Lösung auf p_H 12 zu bringen. Dann gibt man 1,0 ml der Lösung A in eine Küvette (nicht mehr, weil sonst die zu hohe Natriumnitratkonzentration stört), setzt die zuvor ermittelte Menge Natronlauge und 1 ml Ca-Lösung (50 μg/ml) und sodann 0,8 ml Murexidlösung (0,045 g/250 ml) und 0,2 ml 4 n Natronlauge zu und füllt mit Wasser auf 8,0 ml auf. Man titriert mit 0,01 m ÄDTA-Lösung unter Verwendung einer automatischen Mikrobürette. Daneben titriert man eine Reagentienblindprobe, in der die Probelösung durch 4,0 ml 0,25 n Salpetersäure ersetzt ist. Die Genauigkeit beträgt 0,4 μg Calcium. *Zur Titration von Calcium + Magnesium* verdünnt man 1 ml der Lösung A mit Wasser auf 10,0 ml und gibt zu einem aliquoten Teil 10 ml einer Eriochromschwarz T-Lösung, die 5 mg Indicator in 250 ml Pufferlösung p_H 10—10,5 (siehe unten) enthält. Man titriert mit 0,01 m ÄDTA-Lösung. Eine Blindprobe wird wie oben beschrieben daneben untersucht. Die Genauigkeit liegt bei 0,3 μg Magnesium. Man muß die ermittelten Werte mit dem Faktor 0,97 multiplizieren, um den Fehler, der durch das Volumen des Phosphatniederschlags entsteht, zu eliminieren. — *Pufferlösung.* Man mischt 57 ml konz. Ammoniak, 6,8 g Ammoniumchlorid, 6,6 g Kaliumcyanid und 0,2 g Hydroxylaminhydrochlorid und füllt mit Wasser auf 1 l auf. Das Cyanid verhindert Störungen durch Kupfer oder Eisen.

[1] Analyst **85**, 519—521 (1960). Dep. of Biochem., Univ. Queensland, Brisbane (Australien). — [2] J. Lab. clin. Med. **45**, 951 (1955). URSULA BAUMANN

Eine Methode zur Trennung, Bestimmung und Analyse von Calciumseifen aus menschlichem Stuhl geben H. G. SAMMONS und S. M. WIGGS[1] an. Sie beruht auf der Beobachtung, daß die Calciumseifen bei Schütteln mit Äther in diesen ungelöst als Suspension hineingehen. Andere organische Lösungsmittel sind weniger geeignet, und in Chloroform sind die Calciumseifen löslich. — *Ausführung.* Der 24 Std-Stuhl wird unter Vermeidung von Luftzutritt homogenisiert. 10 ml gibt man mit einer Spritze in einen Scheidetrichter und schüttelt mit der 3fachen Menge Äther einige Minuten. Nach Absetzen läßt man die Wasserphase ab und wäscht den Äther mit wenig Wasser. Die Wasserphase einschließlich Waschwasser extrahiert man in gleicher Weise noch 2mal. Die vereinigten Ätherphasen zentrifugiert man 10 min mit 3000 U/min, gießt den Äther ab und wäscht noch 2mal ebenso mit Äther. Nach Abdunsten des Restäthers wägt man die Kalkseifen. Für die Analyse geben Verff. 2 Wege an: 1. Man hydrolysiert mit 2 n Salzsäure 30 min auf kochendem Wasserbad, extrahiert die Fettsäuren nach Abkühlen mit Petroläther, den man unter vermindertem Druck in sauerstofffreier Stickstoffatmosphäre entfernt, und bestimmt sie durch Wägen. Das Calcium in der wäßrigen Phase läßt sich nach A. A. HENLY und R. A. SAUNDERS[2] bestimmen. 2. Man erhitzt 1 Std mit methanolischer 1 n Salzsäure am Rückflußkühler und läßt über Nacht bei 37° C stehen. Die Lösungsmittel entfernt man bei vermindertem Druck unter sauerstofffreien Bedingungen wie oben. Nach Zusatz von etwas Aluminiumoxyd und wasserfreiem Natriumsulfat löst man die Methylester in Petroläther, verjagt im Filtrat den Petroläther wie oben und wägt die Methylester. Diese Ester kann man noch nach A. J. P. MARTIN und A. T. JAMES[3] chromatographieren.

[1] Clin. chim. Acta (Amsterdam) **5**, 141—145 (1960). Metabolic Res. Unit, Little Bromwich General Hosp., u. Univ. Birmingham (England). — [2] Analyst **83**, 584 (1958); vgl. diese Z. **169**, 306 (1959). — [3] Biochemic. J. **63**, 138 (1956); vgl. diese Z. **154**, 438 (1957). E. MÜLLER, Würzburg

Eine vereinfachte colorimetrische Quecksilberbestimmung in biologischem Material geben D. L. Sorby und E. M. Plein[1] an. Verff. kombinieren die Aufschlußmethode von D. Polley und V. L. Miller[2] und die Quecksilberbestimmung von J. B. Plein und E. M. Plein[3]. — *Arbeitsvorschrift.* Man gibt 1 g (je nach Hg-Gehalt) der Probe in einen 250 ml-Erlenmeyer-Kolben, läßt durch den aufgesetzten Allihn-Kühler 5 ml konz. Schwefelsäure (bei viel organischer Substanz 10 ml) zufließen, erhitzt auf einem Dampfbad und setzt tropfenweise 50%ige Wasserstoffperoxidlösung unter Schütteln so lange zu, bis die Probe klar und nahezu farblos geworden ist. Nun wird das Dampfbad durch einen Brenner mit Asbestplatte ersetzt und weiter 50%ige Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt, bis die zunächst wieder dunkel gefärbte Lösung 2—3 min lang nach der letzten Zugabe farblos bleibt. Nach dem Abkühlen und Versetzen mit 10 ml Wasser fügt man tropfenweise 5%ige Kaliumpermanganatlösung bis zur Rosafärbung zu, versetzt dann mit 10 ml 20%iger Hydroxylaminhydrochloridlösung (durch Schütteln mit 1%iger Dithizon-Chloroformlösung und Chloroform gereinigt), filtriert in einen 50 ml-Meßkolben und ergänzt mit Wasser zur Marke. Ein aliquoter Teil (10—25 μg Hg) dieser Aufschlußlösung wird in einem 250 ml-Scheidetrichter mit 50 ml 0,25 n Salzsäure vermischt und mit 25 ml Dithizon-Chloroformlösung (4 mg/l) 60 mal geschüttelt. Man läßt die gefärbte Chloroformschicht durch einen in das Scheidetrichterrohr eingeschobenen Baumwollpfropfen in eine Küvette ab und mißt die Absorption der Lösung bei 490 nm mit einem Beckman-DU-Spektralphotometer. Die Eichkurve wird aus folgendermaßen behandelten Proben aufgestellt: 50 ml 0,25 n Salzsäure werden in einem Scheidetrichter mit der Menge konz. Schwefelsäure versetzt, die der aliquote Teil der Aufschlußlösung enthält. Für je 10 ml des zur Analyse verwendeten aliquoten Teils wird hier 1 ml der 20%igen Hydroxylaminhydrochloridlösung zugesetzt. Dann wird eine geeignete Menge einer Quecksilberstandardlösung (1 μg Hg als $HgCl_2$/ml) zugesetzt. Es werden 25 ml der Dithizonlösung zugegeben, dann wird wie bei der Analyse verfahren. Je nach Art der Probe können sich die Aufschlußbedingungen verschieben. Der Fehler bei der Bestimmung beträgt $\pm 5\%$. Je 1 mg Fe, Ni, Pb, Cu, Zn, Cd, Mn und Bi stören nicht.

[1] J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. **49**, 160—162 (1960). Univ. of Washington, Coll. of Pharmacy, Seattle, Wash. (USA). — [2] Analyt. Chemistry **27**, 1162 (1955); vgl. diese Z. **151**, 61 (1956). — [3] J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. **46**, 705 (1957).
R. Ellmer

Eine verbesserte Methode zur photometrischen Bestimmung von Silicium in Harn und Blut geben Shin-Chung Wang, Shu-Chung Liu und Liang-Wang Tsai[1] an. Sie beruht auf der Reaktion von Silicat mit Ammoniummolybdat. Störende, reduzierende Substanzen im Harn lassen sich mit einem schwach basischen Anionenaustauscher beseitigen. Mit Weinsäure läßt sich die Störung durch freies Molybdat und Phosphat beseitigen. Die Resultate stimmen mit denen nach Veraschung mit Natriumcarbonat im Platintiegel überein.

[1] Acta biochim. sinica **2**, 63—71 (1959) [Chinesisch]. (Nach engl. Zus.fass. ref.) Acad. Med. Sci., Peking (China). E. Müller, Würzburg

Ammoniakbestimmung im Blut. Um Störungen des Ammoniakstoffwechsels bei Leberschädigungen untersuchen zu können, bestimmen R. Bockel, M. Imler und A. Frick[1] den Ammoniakgehalt des Blutes nach der Methode von Parnas[2], in der Modifikation von Ambard. Sie beruht darauf, daß das Ammoniak durch Natriumborat in Freiheit gesetzt und mit Wasserdampf im Vakuum bei 37° C in eine bestimmte Menge 0,007 n Salzsäure übergetrieben wird. Den Säureüberschuß titriert man mit 0,007 n Natronlauge gegen Methylrot zurück. Das Blut wird der Vene ent-

nommen und in 1 ml Natriumboratlösung aufgefangen. Es muß 2—3 min nach Entnahme untersucht werden. 25 mg Ammoniak/l können noch genau erfaßt werden.

[1] Röntgen- u. Lab.-Prax. **13**, L 100—L 103 (1960). Lab. de Pathol. interne et exp., Clinique Médicale B. Hospital Civil, Straßburg (Frankreich). — [2] Parnas, J. K., u. J. Heller: Biochem. Z. **152**, 1 (1927); vgl. diese Z. **69**, 368 (1926). Ursula Baumann

Die colorimetrische Eisenbestimmung im Serum mit o-Phenanthrolin haben S. M. Idu, L. Cociumian und S. Ciorapciu[1] dadurch verbessert, daß sie bei dem optimalen p_H-Wert 2 (Farbumschlag von α-Dinitrophenol) arbeiten und Isopropanol als Stabilisator einzelner Reagentien verwenden. — *Ausführung.* Man zentrifugiert 10 ml Blut und versetzt eine möglichst große, gemessene Menge des abdekantierten Serums mit der Hälfte seines Volumens an 6 n Salzsäure. Nach 10 min gibt man ein dem Serumvolumen gleiches Volumen 20%ige Trichloressigsäurelösung zu, mischt, läßt weitere 10 min stehen und filtriert dann durch ein eisenfreies Blaubandfilter. Zum Filtrat (5 ml) gibt man 1 Tr. α-Dinitrophenollösung (1 g Isopropanol auf 100 ml) und neutralisiert mit 10%iger Ammoniaklösung bis zur Gelbfärbung. Nach dem Abkühlen entfärbt man vorsichtig mit 0,5 n Salzsäure, gibt 1 Tr. Hydrochinonlösung (2 g in Isopropanol auf 100 ml) und 2 Tr. o-Phenanthrolinchlorhydratlösung (2 g Salz + 10 ml Isopropanol + Wasser auf 100 ml) zu, läßt 1 Std stehen, ergänzt mit Wasser zur Marke (10 ml) und mißt im Pulfrich-Photometer mit Filter S50 in 20 mm- oder 50 mm-Mikroküvetten gegen Wasser als Vergleichslösung. Eine Reagentienblindprobe wird gleichzeitig unter genau gleichen Bedingungen durchgeführt. Zur Aufstellung der Eichkurve (die eine Gerade ist) dient eine mit Permanganat oxydierte Mohrsche Salzlösung mit 2 µg Fe/1 ml.

[1] Stud. Cercet. Biochim. **3**, 33—38 (1960) [Rumänisch]. (Mit franz. Zus.fass.) Mediz. Klinik I. M. F. Colţea (Rumänien). A. Kurtenacker

Den Magensäuregehalt bestimmen H. L. Segal, R. P. Plosscowe, R. D. Gerle und P. K. Russell[1], indem sie den *Azur A-Spiegel des Blutes* messen. Die Methode hat gegenüber der von H. L. Segal, L. L. Miller und E. J. Plumb[2] bei der die Azur A-Ausscheidung im Urin gemessen wird, den Vorteil, daß das Urinsammeln wegfällt. Die Ergebnisse stimmen bei beiden Methoden überein. — *Arbeitsweise.* Man entnimmt 50 min nach Verabreichung des Farbstoffes Blut aus der Vene, läßt absitzen und zentrifugiert 10 min bei 4500 U/min. 1 ml der überstehenden Lösung versetzt man mit 4 ml Wasser, 1 ml 0,5 n Salzsäure und 1 Tr. Kupfersulfatreagens [195 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in 100 ml 18%iger (6 m) Salzsäure gelöst] und stellt die Probe 10 min in ein Propylenglykolbad von 90°—95° C. Dann kühlt man 5 min in einem Wasserbad von 20°—25° C ab, mißt die Extinktion bei 630 nm bei einer Spaltbreite von 0,035 mm, setzt 75—100 mg l-Ascorbinsäure zu (Reduktion des Farbstoffs zur Leukoform) und mißt die Extinktion noch einmal. Die Werte werden einer Eichkurve entnommen. Die Standardansätze enthalten neben den verschiedenen Azur A-Mengen 1 ml Serum, 1 ml 0,5 n Salzsäure und 1 Tr. Kupfersulfatreagens und werden wie die zu untersuchenden Proben aufgearbeitet.

[1] J. Lab. clin. Med. **55**, 815—819 (1960). Depts. of Med., Genesee Hosp., Strong Memorial Hosp., and Rochester Municipal Hosp., and Univ. of Rochester, School of Med. and Dent., Rochester, N.Y.(USA). — [2] Gastroenterology **28**, 402 (1955). Ursula Baumann

Chromatographische Methoden zum Nachweis biogener Amine beschreiben J. Awapara, V. E. Davis und O. Graham[1]. Die Methoden wurden bei der Untersuchung keimender Gerste, bzw. zur Isolierung des darin enthaltenen *Hordenins* entwickelt. Neben Hordenin (in höherer Konzentration als bisher in der Literatur angegeben), wurden acht weitere Amine nachgewiesen. — *Arbeitsweise.* 1. *Trennung*

der Mono- und Dicarboxyaminosäuren von Aminen und basischen Aminosäuren an Austauscherharzen. Man schüttelt die zu untersuchende Lösung 1 Std mit einem Überschuß Amberlite CG-50 Type 2 (200 mesh H^+-Form), das nach der Methode von HIRS, MOORE und STEIN[2] gereinigt wurde. Man gibt das Gemisch in eine 1×15 cm-Kolonne, die 1 g Harz enthält, läßt absitzen und eluiert die Aminosäuren mit Wasser, und die Amine und basischen Aminosäuren mit 2mal 10 ml 4 n Essigsäure. Die Trennung ist quantitativ. Die Methode ist brauchbar, um Amine, die durch Einwirkung von Aminosäuredecarboxylasen aus Aminosäuren entstehen, von diesen zu trennen. 2. *Trennung von Aminen an Cellulosesäulen.* Man füllt Kolonnen mit pulverisierter Cellulose von 200 mesh (mit Natronlauge, Salzsäure und Wasser vorbehandelt), die in der verwendeten Chromatographierflüssigkeit aufgeschlämmt ist. Man spült solange mit dem Chromatographiergemisch nach, bis die Extinktion der abfließenden Flüssigkeit bei 279 nm konstant ist und keine Reaktion mit Ninhydrin ergibt. Dann bringt man die zu untersuchende Lösung auf und chromatographiert entweder mit Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1 oder 4:1:1,6). Im ersten Fall ist die Trennung der Amine voneinander befriedigend, besonders der aromatischen. Stärker polare Substanzen wie Epinephrin oder Norepinephrin trennen sich besser mit dem zweiten Gemisch. Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt 4 ml/Std, 1 ml-Fraktionen werden jeweils untersucht. Die Substanzen werden spektrophotometrisch bei 279 nm oder mit Ninhydrin bestimmt. 3. *Trennung von Aminen durch Papierchromatographie.* Die Gemische werden auf Whatman-Papier 3 MM absteigend entweder mit einem der oben angegebenen Gemische oder mit 2-Butanon-Propionsäure-Wasser (3:1:1,2) getrennt. Die Ergebnisse sind bei letzterem besonders günstig. Die R_f-Werte für 26 Substanzen sind angegeben.

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **3**, 11—19 (1960). Rice Inst., Biol. Dep., Houston, Texas (USA). — [2] HIRS, C. W. H., S. MOORE u. W. H. STEIN: J. biol. Chemistry **200**, 493 (1953); vgl. diese Z. **146**, 150 (1955). — [3] MOORE, S., u. W. H. STEIN: J. biol. Chemistry **211**, 907 (1954). URSULA BAUMANN

Eine gaschromatographische Untersuchung der unveresterten Serumfettsäuren des Menschen führen W. SCHRADE, E. BÖHLE, R. BIEGLER und C. SABEL[1] durch[2]. Die Fettsäuren werden in einem Pye-Gaschromatographen fraktioniert, dessen Kolonne ($120 \times 0{,}4$ cm) mit Chromosorb W (80—100 mesh) und Reoplex 400 (20%) gefüllt ist. Die Versuchstemperatur beträgt 179° C, die Gasgeschwindigkeit 36 ml/min Argon, der Druckabfall 0,72 atü. Es wird festgestellt, daß im Nüchternserum von Stoffwechselgesunden je 27% Palmitin- und Ölsäure, 14,3% Stearinsäure und geringe Mengen Laurin-, Myristin-, Palmitolein-, Linol- und Arachidonsäure vorhanden sind. Daneben werden einige noch nicht identifizierbare Säuren gefunden. Die Zusammensetzung ist individuell sehr verschieden. Die Verff. untersuchen außerdem die Änderung der Fettsäurezusammensetzung bei Diabetes, Hunger und Glucose- oder Insulinzufuhr.

[1] Klin. Wschr. **38**, 707—716 (1960). 1. Med. Univ. Klinik, Frankfurt a. M. — [2] JAMES, A. T., u. A. J. P. MARTIN: Biochemic. J. **50**, 679 (1952); vgl. diese Z. **142**, 449 (1954). URSULA BAUMANN

Eine spezifische und ausreichend exakte Methode zur Routinebestimmung der Triglyceride im Blut beschreibt A. RANDRUP[1]. — *Ausführung.* Man bringt 3—5 ml venöses Blut (Nüchternenblut) in heparinisierte Reagensgläser (500 E/Glas), kühlt in Eiswasser ab und zentrifugiert 7 min bei 3000 U/min. Man trennt das Plasma ab und zentrifugiert nochmals 7 min bei 2000 U/min. Man kühlt das Plasma auf 10° C ab und arbeitet eine Probe davon folgendermaßen auf: Man gibt 0,5 ml Plasma in 10 ml n Hexan-Isopropylalkohol (1:1), läßt $^1/_2$ Std unter gelegentlichem Umschütteln stehen, setzt 40 ml physiologische Kochsalzlösung zu, schüttelt 1—1,5 min

und zentrifugiert den Niederschlag mit 2000 U/min ab. Die obere Phase enthält die Lipide. 3 ml dieser Schicht versetzt man mit 9 ml Hexan-Äther (65:10), schüttelt um und gibt 500 mg aktivierte Kieselsäure zu, die die Phospholipide absorbieren soll. Man läßt 1,5 Std stehen (ab und zu umschütteln) und zentrifugiert die Kieselsäure in 1 min bei 1000 U/min ab. 10 ml der überstehenden Lösung dampft man bei 70° C unter Stickstoff zur Trockene ein (Glasperle zusetzen), gibt 4 ml Bariumhydroxydlösung [7 g $Ba(OH)_2 \cdot 8\,H_2O$ in 200 ml Wasser und 10 ml Hexan gelöst und 24 Std stehen gelassen] zum Rückstand und verseift über Nacht bei 85° C. Man läßt abkühlen und setzt 3 ml 0,367 n Salzsäure zu. Nach 15 min gibt man 5 ml Hexan zu, schüttelt 1—1,5 min lebhaft um, zentrifugiert 5 min bei 1000 U/min und trennt die Phasen so gut wie möglich. Die untere, wäßrige Phase enthält jetzt alles Glycerin, das aus den Triglyceriden freigeworden ist. Die weitere Behandlung ist eine Modifikation von [2]. 5 ml der wäßrigen Phase versetzt man in einem 50 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 50 μl Perjodsäure (153 mg H_5JO_6 zu 10 ml in Wasser gelöst und über einem Trocknungsmittel aufbewahrt) und gibt nach 10 min 500 μl Phenylhydrazinlösung (454 mg salzsaures Phenylhydrazin zu 25 ml in Wasser gelöst) zu und läßt weitere 10 min stehen. Während der ganzen Zeit soll die Probe vor Licht geschützt werden. Man setzt nun 200 μl Kaliumhexacyanoferrat (III)-lösung [455 mg $K_3Fe(CN)_6$ zu 10 ml in Wasser gelöst] zu, stellt die Probe in ein Eisbad und tropft innerhalb 4 min 2,5 ml konz. Salzsäure zu. Man mißt die Extinktion der roten Lösung nach 11 bis 16 min bei 530 nm und entnimmt die Werte einer Eichkurve, die mit Triolein-(Merck)-Lösungen aufgestellt wird. Die Standardlösungen werden zunächst zur Trockne eingedampft, dann mit 10 ml Hexan-Isopropylalkohol aufgenommen, mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und dann aufgearbeitet wie oben beschrieben. Das Triolein-Präparat muß vor Gebrauch gereinigt werden. Man löst es in Hexan-Äther (99:1), schüttelt mit 0,05 n Natronlauge aus und bringt die Lösung auf eine Kieselsäure-Hyflo Supercel-Säule (2:1) auf, die vor Gebrauch einige Male mit Äther, dann mit Hexan durchgespült wurde. Dann löst man die Sterin-Ester mit Hexan-Äther (99:1) ab und kann danach das reine Triolein mit Hexan-Äther (97,5:1,5) eluieren.

[1] Scand. J. clin. Lab. Invest. **12**, 1—9 (1960). Novo Terapeutisk Lab. A/S, Kopenhagen (Dänemark). — [2] Desnuelles, P., u. M. Naudet: Bull. Soc. chim. France **12**, 871 (1945). — Biggs, A.: Analyt. Chemistry **26**, 602 (1954); vgl. diese Z. **144**, 316 (1955).

Ursula Baumann

Eine Methode zur potentiometrischen Ermittlung des Endpunktes bei der jodometrischen Bestimmung von Plasmalogen teilt W. T. Norton[1] mit. Es handelt sich um die entsprechende Modifikation der von M. M. Rapport und B. Lerner[2] angegebenen Methode. Man erreicht damit höhere Genauigkeit besonders bei gefärbten Proben, benötigt kleinere Proben und vermeidet Jodverlust. — *Ausführung.* Den nach J. Folch, M. Lees und G. H. Sloane-Stanley[3] hergestellten Organextrakt bringt man im Vakuum bei 40° C zur Trockne, löst in Chloroform-Methanol (2:1) und füllt das Filtrat so auf, daß es 1—3 μMol Plasmalogen/ml enthält. In einem 10 ml-Gläschen versetzt man 1,00 ml dieser Lösung mit 1,00 ml wäßriger 0,01 n Jodlösung, mischt gut für 30 sec und verdünnt mit 3,0 ml 95%igem Äthanol. Unter Verwendung einer Mikroplatin- und Kalomelelektrode titriert man schnell mit 0,1 n Natriumthiosulfatlösung aus einer 0,1 ml Ultramikrobürette. Die letzten 0,01 ml setzt man in 0,001 ml-Portionen zu. Den Endpunkt ermittelt man in üblicher Weise graphisch aus der S-förmigen Titrationskurve. 0,5 μMol lassen sich mit einer Genauigkeit von $\pm$ 2% und 3 μMol mit einer solchen von $\pm$ 0,3% bestimmen.

[1] Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **38**, 340—342 (1960). Dep. Med., Div. Neurology, Dep. Biochem., Albert Einstein College Med. Yeshiva Univ., New York, N.Y. (USA). — [2] Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **33**, 319 (1959). — [3] J. biol. Chemistry **226**, 497 (1957); vgl. diese Z. **168**, 315 (1958). E. Müller, Würzburg

Die Bestimmung von Tetrachlorkohlenstoff und Äthanol in Blut nehmen R. D. Stewart, T. R. Torkelson, C. L. Hake und D. S. Erley[1] mit Hilfe der Infrarotspektroskopie vor. *Kaninchen* werden einer Tetrachlorkohlenstoffatmosphäre (5000 bzw. 2500 ppm, 4 Std) ausgesetzt und nach 1,5, 4, 4,5 und 6,5 bzw. 8,5 Std werden Blutproben entnommen. Die Hälfte jeder Gruppe bekommt zusätzlich 3 ml Äthanol/kg Gewicht verabreicht. Die Blutproben werden mit Oxalat wie üblich behandelt. 5 ml des Oxalatblutes versetzt man mit 10 ml CS_2 und schüttelt vorsichtig 5 min. Die organische Phase (meist 7 ml) wird mit einer Pipette in die 16 mm-Meßzelle überführt. Man mißt gegen reines Lösungsmittel. Die Nachweisgrenze für Tetrachlorkohlenstoff beträgt 1 ppm (Bande bei 12,8 μ), für Äthanol 10 ppm (Bande bei 9,55 μ). Die Methode kann für andere organische Lösungsmittel, z. B *Aceton*, und *in anderen biologischen Flüssigkeiten* ebensogut angewendet werden.

[1] J. Lab. clin. Med. **56**, 148—156 (1960). Med. Dep., Biochem. Res. Lab. und Spectroscop. Res. Lab., The Dow Chem. Comp., Midland, Mich. (USA).

Margot Zimmermann

Nachweis und quantitative Bestimmung von Äthanolamin und Serin in Lipidhydrolysaten beschreiben W. L. Magee, R. W. R. Baker und R. H. S. Thompson[1]. Als *Ausgangsmaterial* dienen die Kephalin-Fraktionen III und V des menschlichen Gehirns[2], die reich an Phosphatidyl-serin bzw. -äthanolamin sind. Man dialysiert die Fraktionen, um die Nichtlipide zu entfernen[3], emulgiert sie in Wasser, unterwirft sie der Gefriertrocknung und kann sie im Vakuum über Phosphorpentoxyd aufbewahren. — *Zur Hydrolyse* behandelt man 15—40 mg des Lipid-Präparates in einem zugeschmolzenen Pyrexglas (15×125 mm) mit 4 ml 2 n Schwefelsäure 12 Std im siedenden Wasserbad. Man überführt das Hydrolysat quantitativ in ein Zentrifugenglas, setzt 3 Tr. einer 0,1%igen wäßrigen Methylrot-Lösung zu und neutralisiert unter ständigem Rühren durch Zugabe von festem Bariumcarbonat. Man zentrifugiert und gießt die überstehende Lösung in einen 10 ml-Meßkolben, wäscht den Rückstand zweimal mit je 2,5 ml Wasser nach und füllt auf 10 ml auf. Gleichzeitig bearbeitet man eine Blindprobe (4 ml 2 n Schwefelsäure) und zwei Standardproben (20 oder 40 μMol Serin oder Äthanolamin in 4 ml 2 n Schwefelsäure) ebenso. Das Hydrolysat wird *papierchromatographisch* weiterverarbeitet, indem man 20—60 μl auf Whatman-Papier 3 MM (30×3 cm) aufträgt und absteigend 2—4 Std mit Methyläthylketon-Methylcellosolve-20%iger Essigsäure (40:15:20) chromatographiert. Die Standardlösungen läßt man daneben mitlaufen. Man trocknet bei Zimmertemperatur und taucht die Chromatogramme in ein frisch bereitetes Ninhydrin-Zinn(IV)-chloridreagens (4 mg $SnCl \cdot 2\,H_2O$ in 5 ml frisch bereitetem 0,2 m Citratpuffer vom p_H 5,0 lösen, 0,25 g Ninhydrin zufügen, mit Isopropanol auf 50 ml auffüllen und 60 min schütteln), trocknet bei Zimmertemperatur und erwärmt es 90 min auf 50° C. Die angefärbten Stellen schneidet man aus (gleich große Stücke von Test und Standard), zerschnippelt sie und schüttelt sie 30 min mit je 5 ml 50%igem wäßrigem Äthanol. Man filtriert und mißt die Extinktion in 1 cm-Küvetten bei 570 nm gegen 50%igen Alkohol.

[1] Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **40**, 118—123 (1960). Dep. Chem. Pathol., Guy's Hosp. Med. School, London (England). —[2] Folch, J.: J. biol. Chemistry **146**, 35 (1942). — [3] Folch, J., M. Lees u. D. H. Sloane-Stanley: J. biol. Chemistry **226**, 497 (1957); vgl. diese Z. **168**, 315 (1959). Ursula Baumann

Die spektrophotometrische Bestimmung von Aminen, Aminosäuren und Peptiden mit 2,4,6-Trinitrobenzol-1-sulfonsäure (TNBS) beschreiben K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi und T. Shinoda[1]. Man versetzt 1 ml der zu untersuchenden Lösung (0,01—0,8 μMol/ml) mit 1 ml 1%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und 1 ml 0,10%iger TNBS-Lösung und hält das Gemisch unter Lichtausschluß 2 Std

auf 40° C. Dann gibt man eine definierte Menge (a ml) 1 n Salzsäure zu und mißt die Extinktion bei 340 nm gegen a ml Wasser. Die nitrophenylierten Substanzen können aus der Meßlösung isoliert und zur Strukturanalyse weiter verwendet werden. Es wurden *Tyramin, Histamin, Glucosamin, Äthanolamin, β-Alanin, γ-Aminobuttersäure, p-Aminobenzoesäure, Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystin, Methionin, Histidin, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, ε-Aminocapronsäure, Putrescin, Cadaverin, Isoamylamin, Glycyl-glycin, -serin, -valin, -tyrosin, -tryptophan, -histidin, -asparaginsäure, Alanylglycylglycin, Leucyltyrosin, Alanylasparagin, Carnosin, Glutathion und oxydiertes Insulin A* und *B* bestimmt.

[1] J. Biochem. (Tokyo) **47**, 654—660 (1960). Dep. Chem., Fac. Sci., Tokyo Metropolitan Univ., Tokio (Japan). URSULA BAUMANN

Aminosäuren. *Eine Bestimmung von Aminosäuren im Sputum* beschreiben A. KOBAN und M. BÜCHNER[1] (vgl. auch[2]). *Zur Bestimmung der freien Aminosäuren* wird das Sputum mit einem Methanol-Acetongemisch (6:2) enteiweißt, das Gemisch nach 30 min Stehen im Eisschrank scharf abzentrifugiert und im Vakuumexsiccator zur Trockne eingedampft. Man nimmt den Rückstand in 0,5 ml Wasser auf und trägt 0,02 ml dieser Lösung auf einen Papierstreifen auf. Man chromatographiert aufsteigend 24 Std mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1), trocknet bei 110° C und besprüht mit 0,2%iger Ninhydrinlösung in Aceton. Nach 15 min ist die Färbung voll entwickelt. — *Zur Bestimmung der Bausteinaminosäuren* hydrolysiert man 1 ml des Sputums mit 10 ml 6 n Salzsäure 24 Std bei 110° C in einem zugeschmolzenen Glasrohr. Man filtriert und dampft bei 60—70° C im Vakuum zur Trockne ein. Den Rückstand nimmt man in 1 ml Wasser auf und verwendet 0,01 ml zur Chromatographie wie oben.

[1] Ärztl. Lab. **6**, 214—215 (1960). — [2] SCHÜTZE, C. H., u. M. BÜCHNER: Dtsch. Gesundheitswes. **15**, 1229 (1960). URSULA BAUMANN

Über chromatographische Methoden zur Bestimmung von Aminosäuren berichten F. BUSSON, R. CARBIENER und J. LANZA[1]. Es handelt sich um eine zusammenfassende Schilderung bekannter Verfahren. Sie gliedert sich in eine kurze historische Übersicht; Gewinnung der Analysenproben; enzymatische, alkalische und saure Eiweißhydrolyse; Reinigung des Hydrolysates für die Papierchromatographie und deren Durchführung; Chromatographie an Austauschersäulen einschließlich der automatischen Aminosäurenanalyse. Dem Bericht sind Abbildungen und Schaubilder beigegeben.

[1] Ann. Nutr. (Paris) **14**, Techniques 1—36 (1960). Lab. Rech. biochim., Serv. Santé des Troupes d'Outre-Mer, Parc du Pharo, Marseille-VII (Frankreich).
E. MÜLLER, Würzburg

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren nehmen K. SCHARRER und K. O. RÄKER[1] auf papierchromatographischem Wege vor. Zur Hydrolyse werden 250 mg Eiweiß mit 200 ml 6 n Salzsäure 18 Std auf dem Sandbad bei 119° C erhitzt. Nach Filtrieren durch Blaubandfilter wird der Aufschluß im Vakuum bei 60° C eingeengt, die restliche Salzsäure wird im Vakuum über Natriumhydroxid entfernt, man füllt dann auf 100 ml mit Wasser auf. Eine Entsalzung ist nicht notwendig. Zur *Papierchromatographie* wird Papier Schl. & Sch. 2043 b Mgl verwendet, als *Fließmittel* dienen für die einzelnen Aminosäuregruppen unterschiedliche, pufferhaltige Lösungsmittelgemische. Für *Arginin* und *Lysin*: 2,4-Lutidin-Phosphatpufferlösung vom p_H 6,2 (1:1). *Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Cystin, Glykokoll, Threonin* und *Alanin*: Phenol-Phosphatpufferlösung vom p_H 12 (1:1). *Phenylalanin*: o-Kresol-Phosphatpufferlösung vom p_H 6,2 (1:1). *Valin, Methionin, Isoleucin* und *Leucin*:

Methyläthylketon-Pyridin-Boratpuffer vom p_H 8,4 (70:15:12,5). Man läßt Aminosäuregemische bekannter Zusammensetzung mitlaufen, wobei diese um nicht mehr als 15% von derjenigen des Hydrolysats abweichen soll. Für die quantitative Bestimmung wird mit Ninhydrin angefärbt. Durch Besprühen mit Kupfernitratlösung wird in den stabileren Kupferkomplex übergeführt. Man schneidet die entsprechenden Flecken aus, eluiert mit Methanol und mißt die Extinktion bei 504 nm. Die Einzelheiten der Durchführung entnehme man dem Original.

[1] Z. Tierphysiol. Tierernähr. **15**, 18—29 (1960). Agrikult.-chem. Inst. Univ. Gießen. L. Acker

Die Kombination von Elektrophorese und Chromatographie zur Trennung von Aminosäuren aus biologischem Material beschreiben G. Biserte, T. Plaquet-Schoonaërt, P. Boulanger und P. Paysant[1]. (Vgl. auch [2].) Die Methode eignet sich auch zur Trennung von Oligopeptiden. Sie umfaßt folgende Manipulationen: 1. Elektrophoretische Fraktionierung des Ausgangsmaterials in einem flüchtigen Puffer [Pyridin-Essigsäure-Wasser (30:100:4870 oder 30:100:3870) bei p_H 3,9]. Man elektrophoresiert 4 Std bei 300—400 V, hier mit der von E. L. Durrum[3] entwickelten Apparatur. 2. Automatische Elution[4] der neutralen Komponenten aus dem Elektropherogramm (1). Anschließende zweidimensionale Fraktionierung durch a) 18stündige Elektrophorese bei p_H 2,4 (n Essigsäure) und 400 V und b) absteigende Chromatographie mit Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5). 3. Automatische Elution der basischen Komponenten aus dem Elektropherogramm (1). Fraktionierung durch Elektrophorese bei p_H 6,5 [flüchtiger Puffer Pyridin-Essigsäure-Wasser (200:8:1792), 15 Std, 400 V] und p_H 11,7 (1 n Ammoniak, 15 Std, 400 V). 4. Chromatographische Trennung der sauren und schwach basischen Komponenten auf dem Elektropherogramm (1) mit Butanol-Essigsäure-Wasser. Die Chromatogramme oder Elektropherogramme nach 3 werden an der Luft getrocknet und mit Ninhydrinreagens (siehe unten) getränkt. Man trocknet 1 Std in einer Ammoniakatmosphäre und beläßt die Streifen 15 Std bei 38° C. Zur halbquantitativen Bestimmung schneidet man die Flecken aus, eluiert sie 20 min mit 3 ml Aceton, das 25% Wasser enthält, zentrifugiert und mißt die Extinktion der Eluate innerhalb 1 Std bei 575 nm gegen eine Blindprobe (ein Stück nicht angefärbten Papiers neben dem zu untersuchenden Fleck wird ausgeschnitten, eluiert und die Extinktion bestimmt). Die Substanzen, mit denen die Eichkurven aufgestellt werden, sollen entweder elektrophoretisch oder chromatographisch isoliert worden sein. — *Ninhydrinreagens.* Dieses besteht aus einer 1%igen Lösung in Aceton, das 10% 0,05 m Phosphatpuffer p_H 7 enthält, zum Nachweis von neutralen und dicarboxylierten Aminosäuren und aus einer 1%igen Lösung in Aceton, das 6% Essigsäure enthält, zum Nachweis von basischen Aminosäuren.

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **3**, 25—47 (1960). Labor. de Chim. biol., Fac. de Méd. et de Pharm., Lille (Frankreich). — [2] Biserte, G., P. Boulanger u. P. Paysant: Bull. Soc. Chim. biol. **40**, 2067 (1958); vgl. diese Z. **177**, 392 (1960). — Biserte, G., R. Plaquet u. P. Boulanger: Bull. Soc. Chim. biol. **37**, 831 (1955); vgl. diese Z. **151**, 453 (1956). — Boulanger, P., G. Biserte u. F. Courtot: Bull. Soc. Chim. biol. **34**, 366 (1952). — [3] J. Colloid Sci. **6**, 274 (1951). — [4] Biserte, G.: Bull. Soc. Chim. biol. **39**, 661 (1957); vgl. diese Z. **160**, 364 (1958).

Ursula Baumann

Über die Fraktionierung und Bestimmung von freien Aminosäuren im Serum berichten E. R. Cook und M. Luscombe[1]. Die Säuren werden an Zeocarb 225H adsorbiert und elektrophoretisch in 6 Gruppen aufgetrennt. Diese werden mit o-Cumarinsäure identifiziert. Durch nachfolgende Papierchromatographie erhält man die einzelnen Säuren, die mit Milchsäure und Ninhydrin nachgewiesen und

dann mit Cadmiumsulfatlösung eluiert und colorimetrisch bestimmt werden. — *Arbeitsweise.* Man bereitet eine Kolonne, indem man ein Glasrohr (5 cm lang, 0,4 cm ⌀), das an einem Ende zu einer Spitze ausgezogen und mit Glaswolle verschlossen ist, mit einer Aufschlämmung von Zeocarb 225H (siehe unten) füllt. Man läßt 1,5 ml frisches Serum durchlaufen, wäscht mit 50 ml Wasser nach und eluiert die Aminosäuren mit 20 ml 10%igem Ammoniak. Das Eluat wird im Vakuumexsiccator über Ätznatron und Calciumchlorid eingedampft. Den Rückstand nimmt man in 5 ml warmem Wasser auf und dampft ihn in einem zuvor mit Silicon behandelten Reagensglas zur Trockne ein (Vakuumexsiccator, über Ätznatron). Diesen Rückstand nimmt man in 0,05 ml warmem Wasser auf, trägt die Lösung auf einen 4×3 cm Whatman-Streifen 3MM auf, läßt antrocknen, spült mit 0,05 ml Wasser nach und trocknet im kalten Luftstrom. Dann elektrophoresiert man 2,5—3 Std in 1 n Essigsäure bei 1350 V und 2,5 mA/5 cm (vgl.[2,3]) und trocknet anschließend das Papier im kalten Luftstrom. Man tränkt die Streifen in Aceton, das 0,1% o-Cumarinsäure enthält und trocknet sie erst 4—5 min bei Zimmertemperatur, dann 1,5—2 min bei 100° C. Unter dem UV-Licht erscheinen die 6 einzelnen Gruppen, die markiert und ausgeschnitten werden. Man extrahiert die Gemische 2 Std mit je 5 ml Wasser unter gelegentlichem Schütteln. Aliquote Teile (3—4 ml) werden in einem mit Silicon behandelten Reagensglas im Exsiccator über Ätznatron eingedampft. Den trockenen Rückstand nimmt man in 0,02 ml Wasser auf und bringt die Lösung als dünnen Strich auf einen Streifen Whatman-Papier Nr. 1 (57×20 cm) auf, wäscht das Glas mit 0,02 ml Wasser nach und trägt das Waschwasser ebenso auf. Man trocknet im kalten Luftstrom und chromatographiert absteigend mit Butanol-Äthanol-Äthylacetat-Wasser-Eisessig (60:15:10:20:2 für Bande 1—5 des Elektropherogramms, 40:15:10:20:20 für Bande 6). Bande 1, 2, 3 und 5 brauchen 40 Std, Bande 3 24 Std und Bande 6 72—96 Std zur Trennung. Man trocknet die Chromatogramme im kalten Luftstrom, besprüht sie mit einer Lösung von 2 ml Milchsäure und 2 g Ninhydrin in 100 ml 95%igem Alkohol und trocknet 10 min bei Zimmertemperatur und 4 min bei 105° C. Die Flecken werden ausgeschnitten und 10—20 min in 7,5 ml 90%igem Alkohol + 0,2 ml 1%iger wäßriger Cadmiumsulfatlösung eluiert. Man mißt die Extinktion der (über Nacht stabilen) rosa Lösung mit einem Grünfilter (hier Ilford Grünfilter 604). Die Werte werden aus Eichkurven abgelesen. — *Vorbehandlung des Zeocarb 225H.* Man wäscht 400 g des Austauschers (60—80 mesh) nacheinander mit 1 Liter 6 n Ammoniak, 5 l Wasser, 100 ml 40%iger Salzsäure, 300 ml 20%iger Salzsäure und schließlich mit Wasser chlorionenfrei. Das Material wird unter Wasser aufbewahrt. Sobald die überstehende Lösung gelb wird (3—4 Wochen), ist das Harz unbrauchbar.

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **3**, 75—84 (1960). Royal Nat. Hosp. for Rheumatic Diseases, Bath (England). — [2] McDonald, H. J.: Ionography, Year Book, Publ. Inc. Chicago **1954**, S. 62. — [3] Wieland, T., u. E. Fischer: Naturwiss. **35**, 29 (1948).

Ursula Baumann

Die indirekte polarographische Aminosäurebestimmung durch die Kupferphosphatmethode untersuchen W. J. Blaedel und J. W. Todd[1]. Bei einem bestimmten pH läßt man α-Aminosäuren mit einem Überschuß an unlöslichem Kupferphosphat reagieren, zentrifugiert das überschüssige Kupferphosphat ab und verwandelt das 1:2-Cu-Chelat mit überschüssiger ÄDTA-Lösung in das 1:1-Cu-ÄDTA-Chelat, das dann polarographisch bestimmt wird. Der Grenzstrom ist linear abhängig von der Aminosäurekonzentration und wird mit dem durch eine Standard-Cu-ÄDTA-Lösung erzeugten verglichen. Durch eine einzige Eichung können alle Aminosäuren bis zu 10^{-3} m bestimmt werden, wobei der Fehler $< 4\%$ beträgt; ebenso kann der Gesamtgehalt an Aminosäuren in einem Gemisch genau festgestellt werden. Die kleinste noch nachweisbare Konzentration ist $\approx 2 \cdot 10^{-6}$ m. Die Untersuchungen werden

am besten bei p_H 8,9 durchgeführt. Die Abhängigkeit der Vollständigkeit der Reaktion von der Aminosäurekonzentration wird am Beispiel von *Glycin*, *Glutaminsäure* und *Lysin* betrachtet: bei einer Konzentration von 0,001 m Lysin beträgt der Fehler durchschnittlich 4%; bei aktiveren Aminosäuren oder bei einer Konzentration $<$ 0,001 m ist der Fehler $<$ 4%. Bei kleineren Proben (bis zu 0,005 m) ist der Fehler etwas größer oder es muß eine einzige Aminosäure vorliegen. *Cystin*, *Methionin*, *Leucin*, *Tryptophan* und *Phenylalanin* fallen in konzentrierteren Proben aus, *Histidin* bildet statt des üblichen 1:2-Komplexes einen 2:3-Cu-Aminosäurekomplex, was die Bestimmung ebensowenig stört wie die Gegenwart von bis zu 10^{-3} m Ammoniak. Die Boratkonzentration des Puffers muß unter 0,02 m liegen. Das Verfahren kann auf β-Aminosäuren und höhere Aminosäuren nicht angewendet werden. Es ist wichtig, nichtumgesetztes Cu-Phosphat vor der Zugabe von ÄDTA durch Abzentrifugieren vollständig zu entfernen. Die Analyse des Kupferphosphates ergibt ein Molverhältnis Cu:Phosphat von 5:4 und ein Cu:Na-Verhältnis von 3,75. Untersuchung des Halbwellenpotentials für die Reduktion des Cu-ÄDTA-Komplexes ergab: für eine Cu-Konzentration von 0,001 m $E_{1/2} = -0{,}40$ V, für eine Cu-Konzentration von 0,01 m $E_{1/2} = -0{,}43$ V. Bei Zugabe von 10 Tr. einer 0,5%igen Gelatinelösung zu 50 ml einer 0,001 m Standard-Cu-ÄDTA-Lösung ist $E_{1/2} = -0{,}43$ V, bei 3 Tr. $E_{1/2} = -0{,}40$ V und bei 0 Tr. $E_{1/2} = -0{,}38$ V. — *Ausführung.* Zu einer 1—50 ml-Probe gibt man 2 Tr. 0,5%ige Phenolphthaleinlösung, neutralisiert mit verd. Natronlauge bzw. Schwefelsäure, füllt mit Wasser auf 30 ml auf, versetzt mit 10 ml konz. Boratpufferlösung (siehe unten) und 10 ml Kupferphosphatlösung (siehe unten). Die auf 100 ml verdünnte Lösung läßt man 30 min stehen und schüttelt sie jeweils nach 5 min gut durch. Man zentrifugiert ab und fügt zu einer 50 ml-Probe der überstehenden Lösung 5 ml 1,1 m ÄDTA-Lösung und 3 Tr. 0,5%ige Gelatinelösung zu, gibt die Lösung in die Polarographierzelle bei 25° C, entlüftet 5—10 min lang mit Stickstoff und mißt den Diffusionsstrom bei Cu-ÄDTA-Komplexes, der ein Halbwellenpotential von — 0,4 V hat. — *Borat-Puffer.* Eine 0,20 m Borsäurelösung, die 1,0 m Natriumsulfat enthält, wird mit 50%iger Natronlauge auf p_H 8,75 eingestellt und dann 1:9 verdünnt. — *Kupferphosphat-Reagens.* Man mischt 3,63%ige $Na_3PO_4 \cdot 12\,H_2O$-Lösung, 2,73%ige $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$-Lösung und 2,56%ige Na_2HPO_4-Lösung im Verhältnis 1:1:4, kocht 2 Std am Rückfluß und läßt 24 Std absitzen. Die Mutterlauge wird abgegossen. Ein Teil dieses Stammkonzentrats wird zentrifugiert, die Mutterlauge abgegossen, der Rückstand mit 1:9 verd. Boratpufferlösung gewaschen und in der 20fachen Menge verd. Boratpufferlösung gelöst.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 1018 —1021 (1960). Chem. Dept. Univ. of Wisconsin, Madison, Wisc. (USA). LISELOTT JOHANNSEN

Zur Trennung und zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren in Proteinhydrolysaten verwenden G. L. ATFIELD und C. J. O. R. MORRIS[1] folgende Drei-Stufen-Methode auf Whatman-Papier 3MM zwischen auf $2 \pm 1°$ C gekühlten Platten: Zunächst wird in Pyridin-Acetat-Pufferlösung vom p_H-Wert 6,1 150 min lang mit 100 V/cm elektrolysiert. Lysin, Arginin, Histidin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystinsulfonsäure werden auf diese Weise getrennt. In 2. Stufe wird bei der gleichen Spannung in Ameisensäure (2,5%)-Essigsäure (7,8%)-Lösung (p_H 1,85) 270 min lang elektrolysiert, wobei sich Glycin, Alanin, Serin, Valin, Leucin + Isoleucin, Threonin, Prolin, Glutaminsäure, Phenylalanin + Asparaginsäure, Methioninsulfon und Tyrosin (und Tryptophan, wenn anwesend) trennen lassen. Schließlich wird 360 min bei 100 V/cm in Ameisensäure (2%)-Essigsäure (20%)-Gemisch vom p_H-Wert 1,81, welches 0,002 m an Cadmiumacetat ist, elektrolysiert. Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Asparaginsäure erscheinen dann als getrennte Zonen. Nach dem Trocknen bei 80° C während 15 min wird nach J. HEILMANN, J. BAROLLIER und E. WATZKE[2] mit Cd-Ninhydrinlösung gefärbt, die

Färbung wird 24 Std im Dunkeln entwickelt, die roten Zonen werden ausgeschnitten, mit Methanol eluiert, und schließlich werden die Eluate bei 500 nm (Prolin bei 352 nm) photometriert. Das Lambert-Beersche Gesetz ist bis zur optischen Dichte 0,8 erfüllt. Es wird mit Eichlösungen verglichen. Von 10—20 μg Aminosäuregemisch werden 100 $\pm$ 5% wiedergefunden.

[1] Biochemic. J. **74**, 37 P (1960). Hospital Med. Coll., London (England). — [2] Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **309**, 219 (1957); vgl. diese Z. **167**, 225 (1959). K. CRUSE

Zur Analyse extrem zusammengesetzter saurer und basischer Aminosäurengemische hat W. MATTHIAS[1] eine Kombination einer modifizierten Papierelektrophorese mit der früher angegebenen Keilstreifenpapierchromatographie[2] verwendet. Die Probe wird hierzu auf der engen Brücke des 40×4 cm großen Streifens (Abb. 1) aufgegeben und der Streifen an den Schlitzen mittels Glasstäben in die Elektrophoresekammer eingesetzt, so daß die Brücke von beiden Polen gleich weit entfernt ist. Nach Besprühen mit Pyridin-Eisessig-Wassergemisch (3:10:500) wird mit 150 V 3—5 Std elektrolysiert und der Streifen getrocknet. Der kürzere Teil des Streifens mit den basischen Aminosäuren wird dann abgeschnitten und ein gleich langer Ersatz wieder angenäht, so daß nunmehr durch erneute Elektrophorese (19 Std) die sauren Aminosäuren auf dieses Ersatzstück gelangen. Nun wird nach dem Trocknen abermals abgeschnitten, und zwar derart, daß der längere Streifenteil die Form eines Langfilter-Keilstreifens erhält, auf dem jetzt die neutralen Aminosäuren papierchromatographisch durch Einhängen in Butanol-Eisessig-Wassergemisch (4:1:1) in 2 mal 17 Std entwickelt werden. Der Streifen wird hierfür zuvor im Vakuumexsiccator 30 min lang von jeglichem Pyridin befreit. Nach dem Trocknen werden die Aminosäuren mit Ninhydrin nachgewiesen.

Abb. 1. Papierstreifen zur Kombinationsmethode nach MATTHIAS

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **2**, 434—436 (1959). Inst. f. Pflanzenzüchtung d. Dtsch. Akad. d. Landw.-Wiss., Quedlinburg. — [2] Naturwissenschaften **41**, 17 (1954). — Der Züchter **24**, 313 (1954); vgl. diese Z. **143**, 287 (1954); **150**, 209 (1956). K. CRUSE

Tyrosin (Ty), Tryptophan (Tr) und Phenylalanin (PA) lassen sich polarographisch einzeln und nebeneinander bestimmen, wenn sie als Nitroderivate polarographiert werden. D. MONNIER, J. VOGEL und P. E. WENGER[1] geben hierfür folgende *Vorschriften* an. *Tyrosinbestimmung neben Tr und PA.* 10—20 mg Ty werden in 30 ml 0,15 n Salpetersäure gelöst, man setzt mindestens $^3/_4$ der Tr-Menge an PA hinzu, erwärmt zum Auflösen auf 50—60° C, fügt dann bis zum Auftreten vollständiger Opalescenz 2%ige Quecksilber(II)-acetatlösung in 0,15 n Salpetersäure hinzu, schließlich noch 0,5 ml im Überschuß und beläßt 1—2 Std bei 60° C. Dann wird 15 min zentrifugiert und die überstehende Lösung durch ein Doppelfilter filtriert. Die Lösung wird 2 Std lang mit 20 ml 0,15 n Salpetersäure und einigen Kristallen Natriumnitrit am Rückfluß erhitzt, dann abgekühlt, mit 20%iger Kalilauge neutralisiert und auf 50 ml aufgefüllt. 5—7 ml dieser Lösung werden mit 2 ml Pufferlösung p_H 5 (51,5 ml 0,2 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung und 48,5 ml 0,1 m Citronensäurelösung) vermischt, auf 10 ml aufgefüllt, von Sauerstoff befreit und polarographiert. Die Stufenhöhe bei $E_{1/2} = -0{,}64$ V gegen die Bodenelektrode wird mit Hilfe von Polarogrammen mit Eichzusätzen ausgewertet.

Der mittlere Fehler liegt bei $\pm 3\%$. Die Methode ermöglicht die Analyse auf freies Ty im Blutalbumin, auch die des gesamten Ty nach alkalischer Hydrolyse oder des Ty in Peptiden. Für alle Beispiele sind Vorschriften angegeben. — *Tryptophanbestimmung neben Ty und PA.* 5—30 mg Tr werden wie bei der Ty-Bestimmung vorbehandelt, nach dem Zentrifugieren wird nun aber die Fällung gewaschen, mit 30 ml 1,5 n Salpetersäure, also mit stärker konz. Säure, durch 2stündiges Kochen am Rückfluß nitriert, anschließend neutralisiert (20%ige Kalilauge), durch Zentrifugieren von geringem Niederschlag befreit, auf 50 ml aufgefüllt und ein aliquoter Teil wie bei Tr polarographiert. Die Stufe bei $-0{,}75$ V wird mit Eichzusatz-Polarogrammen ausgewertet. Der mittlere Fehler liegt bei $\pm 5\%$. — *PA-Bestimmung neben Ty und Tr.* Die Probe wird mit 1 ml 10 n Salpetersäure 1,5 Std im Ölbad auf 120° C (am Rückfluß) erhitzt, nach dem Abkühlen durch tropfenweise Zugabe 20%iger Kalilauge neutralisiert, mit 10 ml Wasser in ein Zentrifugierglas übergeführt, dann mit verd. Salpetersäure bis auf den p_H-Wert 2—3 gebracht, mit 5 ml der 2%igen Quecksilberacetatlösung versetzt, 1—2 Std auf 60° C gehalten und schließlich zentrifugiert. Zur Eliminierung von Ty und Tr wird die überstehende Lösung sorgfältig dekantiert, mit 2 ml 0,1 n Salpetersäure und 2—3 Tr. 10%iger Silbernitratlösung (Katalysator)versetzt und nach Zugabe von konz. Permanganatlösung (2—3 ml) 15 min bei 60—80° C oxydiert. Überschüssiges Permanganat wird dann mit Wasserstoffperoxyd entfernt, die Lösung wird mit 20%iger Kalilauge neutralisiert, wobei Hg, Mn und Ag gefällt werden. Dann wird mit Wasser verdünnt, zentrifugiert, die klare, gelbliche Lösung auf 50 ml aufgefüllt und ein aliquoter Teil polarographiert (stets sauerstofffrei). Auch hier wird mit Eichzusätzen ausgewertet. Der mittlere Fehler steigt nicht über $\pm 5\%$. Sollen Tr, Ty und PA nebeneinander bestimmt werden, so wird zunächst auf Ty, die Fällung auf Tr und in einer zweiten Probelösung auf PA analysiert, wie an einer Analyse eines Peptons ausführlich beschrieben ist.

[1] Anal. chim. Acta (Amsterdam) **22**, 369—383 (1960). Univ. Genf (Schweiz). K. Cruse

Einen spezifischen Nachweis von Asparaginsäure auf Papierchromatogrammen gründen H. Stegemann und H. F. Griffin[1] auf die von H. D. Dakin[2] beschriebene Oxydation mit Chloramin-T und anschließende Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure[3]. Im Gegensatz zu Glutaminsäure, die hierbei überhaupt nicht reagiert, gibt Asparaginsäure einen intensiv rotgefärbten Flecken, mit dem noch 1 μg/cm^2 zu erkennen sind. — *Anfärbung der Papierchromatogramme.* Das getrocknete Papierchromatogramm wird kräftig mit 0,02 n Chloramin-T-Lösung (in 50%igem Methanol) besprüht. Die Menge Sprühreagens soll so bemessen sein, daß es 30 bis 45 min dauert, bis das Papier bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet ist. 45 min bis 3 Std nach Zugabe des Chloramin-T-Reagenses wird aus 50—60 cm Entfernung sparsam mit 10%iger Natriumcarbonatlösung besprüht (angewendeter Druck etwa 150—200 mm Hg) und 5 min später in der gleichen Art mit Diazoreagens [0,5 g halbtrockene diazotierte Sulfanilsäure (im Tiefkühlschrank aufbewahrt) wird mit 5 ml kaltem Wasser suspendiert und bis zum Gebrauch im Tiefkühlschrank aufbewahrt]. Bei richtiger Ausführung, die nach Angaben der Verff. einiger Übung bedarf, erscheint die Asparaginsäure sofort als blauroter oder orangeroter Flecken.

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **3**, 150—153 (1960). Med. Forschungsanst. d. Max-Planck-Ges., Silikose-Labor, Göttingen. — [2] Biochemic. J. **11**, 79 (1917). — [3] Pauly, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **42**, 508 (1904). H. Garschagen

Eine colorimetrische Methode zur Bestimmung von Histidin und Histamin teilen P. M. Newman und J. H. Turnbull[1] mit. Mit Jod und Pyridin entsteht eine blaue Farbverbindung, die colorimetrisch ausgewertet werden kann. Das Verfahren

ist für 1—60 μg Histidin oder Histamin anwendbar. Die Eichkurve ist gekrümmt. Die Bestimmung ist auf 5% genau, wobei 3% des Fehlers auf die Extinktionsmessung entfallen. Es können noch 1 μg/ml nachgewiesen und 2 μg/ml quantitativ bestimmt werden. Es stören Histidinmethylester und Histidinamid, die die gleiche Farbreaktion geben, und Tryptophan und Tyrosin durch Verminderung der Farbausbeute. Die violette Farbverbindung wird offensichtlich nur von Verbindungen gebildet, die die β-Aminoäthyl-4 (oder 5)-imidazolstruktur besitzen. Außerdem muß eine freie Aminogruppe vorhanden sein. Dabei nimmt die Farbstärke in folgender Reihenfolge ab: $R \cdot CO_2H \gg RH > R \cdot CO_2 \cdot Me \gg R \cdot CO \cdot HN_2$ [$R = (C_3H_3N_2)CH_2 \cdot CH(NH_2)$]. — *Arbeitsweise.* 3 ml Probelösung mit 1—55 μg Histidin werden in einem 5 ml-Meßkolben mit 1,2 ml Pyridin versetzt. Der p_H-Wert wird mit 0,2 n Natronlauge auf 11,0—12,0 gebracht und die Lösung auf 4,5 ml verdünnt. Mit Hilfe einer Mikrometerspritze gibt man 0,04 ml Reagenslösung zu (eine Lösung von 0,075 g Jod in 10 ml 0,04%iger KJ-Lösung), vermischt alles und läßt bei Raumtemperatur stehen. Genau 30 sec nach Reagenszusatz wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 0,02 n Natriumdithionitlösung unterbrochen. Man verdünnt auf 5 ml, läßt 5 min stehen und mißt die Extinktion innerhalb von 15 min nach Reagenszusatz bei 560 nm in einem Unicam SP 500-Spektrophotometer mit 1 cm-Quarzzellen gegen eine Blindlösung aus allen Reagentien. — Zur Abtrennung von störenden Substanzen kann ein Ionenaustauschverfahren nach K. VOIGT[2] angewendet werden. Lysin und Arginin, die in kleinen Mengen mit eluiert werden, haben keinen Einfluß auf die Bestimmung.

[1] Biochemic. J. **74**, 379—382 (1960). Chem. Dep., Univ. Edgbaston, Birmingham (England). — [2] Biochem. Z. **331**, 127 (1959); vgl. diese Z. **172**, 312 (1960).

MARGOT ZIMMERMANN

Die β-Amino-isobuttersäure im Urin läßt sich nach G. B. GERBER und G. GERBER[1] quantitativ nach Umwandlung in ein Dinitrophenylderivat bestimmen. — *Arbeitsweise.* Zur Untersuchung wird der Urin 1:3 mit 1%iger Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Zu 3 ml dieser Verdünnung gibt man 0,9 ml einer äthanolischen 1%igen Dinitrofluorobenzollösung (frisch zu bereiten). Die Mischung wird 2 Std bei 37° C stark geschüttelt. Dann wird 3mal mit je 10 ml Äther extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit 0,3 ml 3 n Salzsäure angesäuert und wieder 3mal mit je 10 ml Äther extrahiert. Diese Ätherextrakte werden zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Tetrahydrofuran gelöst und zur Papierchromatographie verwendet. Entwickelt wird 10—12 Std mit Heptan-Pyridin (70:30, v/v). Nach vorsichtiger Trocknung werden die Flecke im UV-Licht ausgeschnitten und 2mal mit 15 ml und 1mal mit 10 ml einer wäßrigen 0,3%igen Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Im vereinigten Auszug wird die optische Dichte bei 360 nm gemessen. 1 ml Urin, der 100 μMol zugesetzter β-Amino-isobuttersäure enthält, zeigt eine Lichtdurchlässigkeit von 0,086 bei 360 nm. Eine Eichkurve von β-Amino-isobuttersäure im Urin gelöst, muß aufgestellt werden.

[1] Clin. chim. Acta (Amsterdam) **5**, 607—608 (1960). Div. Exp. Radiology, Univ. Rochester School of Med., N.Y. (USA).

B. ROSSMANN

Über den Nachweis von Hydroxylysin in Serumproteinen berichten E. WALDSCHMIDT-LEITZ, G. BRETZEL und L. KELLER[1]. Mit der *zweidimensionalen Papierchromatographie* weisen Verff. Hydroxylysin in der α- und γ-Serumglobulinfraktion nach. Als Lösungsmittel dienen Butanol-Ameisensäure-Wasser bzw. Phenol-Wasser (R_f-Werte 0,045 bzw. 0,204). Mit der automatisch registrierenden Apparatur von K. HANNIG[2] ermitteln sie den Hydroxylysingehalt der γ-Globulinfraktion beim Menschen zu 0,85% und beim Kaninchen zu 0,60% des Gesamtstickstoffs. Bei Lebercirrhose bzw. radioaktiver Bestrahlung bleiben die Werte unverändert. In

der α-Globulinfraktion sind die Anteile viel geringer. Auf die Möglichkeit einer Beziehung zwischen Hydroxylysingehalt und immunologischer Funktion des γ-Globulins wird hingewiesen, da Hydroxylysin als Baustein anderer Proteine, von Kollagen bzw. Gelatine abgesehen, bislang nicht nachgewiesen ist.

[1] Naturwissenschaften **47**, 254 (1960). Inst. f. org. Chem. d. TH München und Chem. Abt. d. Heiligenberg-Inst., Heiligenberg (Baden). — [2] Clin. chim. Acta (Amsterdam) **4**, 51 (1959); vgl. diese Z. **172**, 151 (1960). E. Müller, Würzburg

Über die Bestimmung von Kreatinin in kleinen Plasmamengen berichten E. Martinez und P. D. Doolan[1]. Zur Anwendung gelangen zwei Methoden. Die eine (exaktere), die mehr Arbeitsaufwand erfordert, ist eine Modifizierung der von J. F. van Pilsum[2] entwickelten. Kreatinin wird dabei in Methylguanidin überführt und die Guanidingruppe mit dem Sakaguchi-Reagens bestimmt. Die andere (für Routinebestimmungen geeignete) basiert auf der üblichen Pikrinsäurebestimmung. Bei beiden Methoden wird das Plasma mit Wolframat enteiweißt. — *Arbeitsweise. Zur Entfernung der Eiweißstoffe* verdünnt man 1,0 ml Plasma mit 1,0 ml Wasser und fügt 1,0 ml 0,66 n Schwefelsäure und dann — tropfenweise — 1,0 ml 5%ige Natriumwolframatlösung zu. Nach 5 min zentrifugiert man 10 min bei 2500 U/min und filtriert. — *Methode 1.* Man stellt das Filtrat mit Natronlauge auf p_H 6,0—7,0 ein und versetzt in einer Küvette 1 ml dieser Lösung mit 1 Tr. 7%iger alkoholischer o-Nitrobenzaldehydlösung und 0,1 ml 2,0 n Natronlauge. Man läßt 20 min stehen, fügt 0,2 ml Pufferlösung zu, schüttelt um und stellt die Probe 10 min in ein siedendes Wasserbad. Dann kühlt man sie in einem Eisbad ab, gibt 0,3 ml vorgekühltes und frisch bereitetes α-Naphtholreagens (0,2 ml 0,2%ige α-Naphthollösung in Alkohol + 1,5 ml 6%ige Harnstofflösung) und nach 5 min 0,2 ml vorgekühlte Natriumhypobromitlösung zu (0,66 ml Brom in 100 ml 5%iger Natronlauge) und läßt noch 30 min im Eisbad stehen. Man stellt die Probe 1 min in ein Wasserbad von 25° C und mißt die Extinktion bei 510 nm. Man mißt gleichzeitig eine Reagentienblindprobe und eine Kontrollprobe (1 ml Serum + 0,2 ml Puffer + 0,1 ml 2,0 n Natronlauge + 1 Tr. o-Nitrobenzaldehydlösung; Reihenfolge beachten, nicht erwärmen, sonst ebenso aufarbeiten wie die Testprobe). Die Werte werden einer Eichkurve entnommen, die täglich neu aufgestellt werden muß. Zur Herstellung der Standardlösung löst man 1,61 g Kreatinin-Zinkchlorid in 1 Liter 0,1 n Salzsäure (Vorratslösung), versetzt diese mit 10 ml 0,1 n Salzsäure und verdünnt auf 100 ml (Arbeitslösung). Die Eichproben werden ebenso behandelt wie die zu untersuchenden Lösungen. — *Methode 2.* Man versetzt in einer Küvette 0,8 ml des enteiweißten Plasmas mit 0,4 ml Pikratreagens (5 Teile gesätt. Pikrinsäurelösung + 1 Teil 10%ige Natronlauge, täglich frisch hergestellt), läßt 15 min bei Zimmertemperatur stehen und mißt die Extinktion bei 500 nm gegen eine Reagentienblindprobe. Gleichzeitig mißt man die Extinktion einer Standardlösung (siehe oben), die 5 μg Kreatinin/ml enthält und errechnet die Milligramm Kreatinin/100 ml nach der Formel: (Extinktion Test/Extinktion Standard) × 2,5. — *Pufferlösung.* 7,5 ml 2,0 n Natronlauge und 50 ml 0,5 n Kaliumdihydrogenphosphatlösung werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und 1 Teil dieser Lösung mit 1 Teil 2,0 n Schwefelsäure gemischt.

[1] Clin. Chemistry **6**, 233—242 (1960). Clin. Invest. Center, U.S. Naval Hosp., Oakland, Calif. (USA). — [2] van Pilsum, J. F., R. P. Martin, E. Kito u. J. Hess: J. biol. Chemistry **222**, 225 (1956); vgl. diese **Z. 157**, 151 (1957).

Ursula Baumann

Über die Bestimmung von austauschbarem Taurin in Rattenorganen berichten H. V. An und P. Fromageot[1]. Mit ^{35}S-Taurin, das Verff. enzymatisch darstellen[2], bestimmen sie nach dem Isotopenverdünnungsverfahren in 23 Organen bzw.

Organsystemen der Ratte den Tauringehalt nach Geschlecht der Tiere getrennt. Die gefundenen Werte stimmen mit denen des extrahierbaren Taurins nach J. Awapara[3] recht gut überein, mit denen zusammen sie in einer Tabelle aufgeführt sind.

[1] Bull. Soc. Chim. biol. **42**, 221—226 (1960). Service Biol., Comiss. Energie Atomique Centre d'Etudes Nucleaires de Saclay, Gif-sur-Yvette (Frankreich). — [2] Chapeville, F., u. P. Fromageot: Biochem. biophysica Acta (Amsterdam) **26**, 538 (1957). — [3] J. biol. Chemistry **218**, 571 (1956). E. Müller, Würzburg

Eine Methode zur Bestimmung von eiweißgebundenem Kohlenhydrat geben R. Shields und W. Burnett[1] an. Es handelt sich dabei um eine Modifikation bekannter Anthronmethoden, die den durch Histidin bedingten Fehler dadurch umgeht, daß man die Extinktion nicht bei 620 nm, sondern bei 585 nm mißt. — *Ausführung.* 4 ml Untersuchungsprobe kühlt man 45 min in einem Eisbad unter 4° C, setzt tropfenweise 8 ml 0,2%ige Anthronlösung (Gew./Vol) in 96%iger Schwefelsäure (höchstens 4 Std vorher ansetzen) zu, stellt nach gutem Mischen für 8 min in ein Wasserbad von 92° C und dann wieder ins Eisbad, um die Reaktion zu stoppen. Nach 30 min mißt man die Extinktion bei 585 nm.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 885—886 (1960). Univ. Dep. Surgery, Western Infirmary, Glasgow (Schottland). E. Müller, Würzburg

Über die Trennung und den Nachweis von Zuckern im Urin in Fällen von Melituria durch Elektrophorese mit hohem Potentialgradienten berichten I. Iuchi und S. Shibata[1]. *Glucose, Fructose, Ribose, Rhamnose, Lactose, Maltose, Saccharose, Glucuronsäure, Glucosamin, Harnsäure* und *Harnstoff-Kreatinin* sind auf den Elektropherogrammen einwandfrei zu identifizieren. *Sorbose* und *Xylose* trennen sich schlecht von *Glucose*, ebenso *Galaktose* und *Fructose* sowie *Ribose* und *Mannose* voneinander. — *Ausführung.* Whatman 1-Streifen (54 × 4 cm) werden mit Boratpuffer (A) p_H 10,8 (20,3 g Borsäure + 327 ml 1 n Natronlauge + Wasser auf 2 l) getränkt; die überschüssige Flüssigkeit wird zwischen Filtrierpapier abgepreßt. 33 cm vom Ende des Streifens trägt man aliquote Teile (10 μl) des verd. Urins (siehe unten) auf und hängt den Streifen in die Apparatur ein. Man elektrophoresiert erst 10 min bei 23 V/cm und 1,1 Milliamp./cm, dann 40 min bei 70 V/cm und 5—7,5 Milliamp/cm. Man trocknet die Streifen vorsichtig, tränkt sie mit einer Silbernitratlösung (siehe unten), trocknet und besprüht gleichmäßig mit 0,5 n Natronlauge. Nach einigen Minuten taucht man die Streifen in halbkonz. Ammoniak, wäscht unter fließendem Wasser aus, preßt zwischen Filtrierpapier ab und trocknet dann. — *Verdünnte Lösung des Urins.* Man verdünnt den Urin um das 4/3fache mit einem Boratpuffer, der ebenso hergestellt wird wie Puffer A (siehe oben), aber nur auf 500 ml aufgefüllt wird. — *Silbernitratlösung.* 1 ml gesättigte wäßrige $AgNO_3$-Lösung wird mit 200 ml Aceton und tropfenweise mit so viel Wasser versetzt, daß sich der gebildete Niederschlag eben auflöst.

[1] Clin. chim. Acta (Amsterdam) **5**, 42—47 (1960). Dept. Clin. Pathol., Yamagushi Med. Coll., Ube (Japan). Ursula Baumann

Zur papierchromatographischen Bestimmung der in wachsenden Knorpeln vorkommenden Zucker haben F. Petrelli, N. Siliprandi und L. Sartorelli[1] folgendes *Verfahren* ausgearbeitet: Man entnimmt von 40 Tage alten Albinoratten oder von 50 Tage alten Kaninchen am Proximalende der Tibia Knorpelstückchen, wäscht diese sorgfältig mit Wasser und erhitzt 250 mg des Gewebes mit 25 ml 0,1 n Salzsäure 10 Std lang auf 100° C unter Rückfluß. Nach Filtration des Hydrolysates dampft man dieses im Vakuum bei einer Temperatur von nicht mehr als 50° C zur Trockne ein, löst den Rückstand in wenig Wasser, dampft dieses wieder

ab und wiederholt diese Manipulation, bis die Lösung den pH-Wert 5 zeigt. Dann nimmt man den Rückstand in etwas Wasser auf und überführt die Lösung quantitativ auf die Spitze einer Absorptionssäule (450×26 mm), die aus einer Mischung gleicher Teile IMAC A 17 und IMAC C 100 (Montecatini), beide 80—100 mesh, besteht. Man wäscht mit 150 ml Wasser nach mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0,8 ml/min, sammelt das Eluat in einem mit 1—2 ml Toluol beschickten Kolben, dampft es im Vakuum bei einer Temperatur von weniger als 50° C zur Trockne ein und nimmt den Rückstand in 0,5 ml kaltgesätt. Benzoesäurelösung auf. Nach Waschen der Kolbenwand mit Methanol verdampft man dieses wieder in einem trockenen Luftstrom. 0,2 ml der Lösung bringt man nun auf einen Streifen Whatman-Papier Nr. 1 und entwickelt nach dem Trocknen mit n-Butanol-Pyridin-Benzol-Wasser (5:3:1:3) nach der Technik von A. A. White und W. C. Hess[2]. Zum Sichtbarmachen der Zuckerflecke besprüht man das Chromatogramm mit einer Mischung gleicher Volumina einer 2%igen Lösung von doppelt dest. Anilin in Äthanol und 0,2 m Citronensäurelösung. Nach dem Trocknen erhitzt man das Papier einige Minuten lang auf 100° C. Durch Vergleich mit auf einem Bezugschromatogramm mitentwickelten bekannten Zuckern erfolgt die Identifizierung. Nach dem beschriebenen Verfahren lassen sich im Hydrolysat Lactose, Galaktose, Glucose, Fructose, Xylose und Ribose nachweisen.

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **3**, 377—379 (1960). Inst. biol. Chemistry, Univ. Padua (Italien). — [2] Arch. Biochem. Biophysics **64**, 57 (1956); vgl. diese Z. **157**, 315 (1957). K. Söllner

Eine Mikromethode zur gleichzeitigen Bestimmung von Glucose und Ketonkörpern im Blut und Glykogen und Ketonkörpern in der Leber beschreibt O. Hansen[1]. Die Methode ist eine Kombination der Glucose-Anthron-Methode von J. H. Roe[2] mit der Ketonkörper-Methode von O. Hansen[3]. Es ist möglich, Glucose bis zu 40 mg/100 ml und Ketonkörper bis zu 0,2 mg/100 ml quantitativ zu bestimmen. Zum qualitativen Nachweis genügt die Hälfte dieser Mengen. — *Ausführung.* 1. *Glucose und Ketonkörper im Blut.* Man pipettiert zwischen 0,200 und 0,025 ml heparinisiertes Blut in ein Zentrifugenglas, das so viel Wasser enthält, daß das Endvolumen 1,6 ml beträgt. Man setzt 0,2 ml 10%ige Natriumwolframatlösung zu, schüttelt um, gibt 0,2 ml genau 0,66 n Schwefelsäure zu, läßt 10 min verschlossen stehen und zentrifugiert 15 min bei 3000 U/min. Zur Glucosebestimmung versetzt man 0,8 ml der überstehenden Lösung mit 1,2 ml Wasser und 10,0 ml Anthronreagens (siehe unten), schüttelt um, erhitzt 15 min im siedenden Wasserbad und kühlt in Wasser ab. Man mißt die Extinktion bei 620 nm gegen eine Reagentienblindprobe und vergleicht mit einer Standardlösung, die 2 ml Glucoselösung (5 mg/100 ml) und 10,0 ml Anthronreagens enthält. Zur Bestimmung der Ketonkörper bringt man 0,5 ml der enteiweißten Lösung in die von Hansen[3] beschriebene Destillationsapparatur, verdünnt mit Wasser auf 15 ml und gibt 1,5 ml Chromschwefelsäurereagens (siehe unten) zu. Man destilliert, bis noch etwa 2 ml im Destillationskolben sind, verdünnt das Destillat auf 15 ml, versetzt 6 ml dieser Lösung in einem 25 ml-Meßzylinder mit Schliffstopfen mit 2 ml einer 0,1%igen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung in 2 n Salzsäure und 10,0 ml Tetrachlorkohlenstoff und schüttelt 5 min lebhaft um. Man trennt die Lösungsmittelphase in einem Scheidetrichter ab, wäscht mit 10 ml Wasser, dann mit 3 ml 0,5 n Natronlauge, schüttelt 3 min, trennt die Phasen und mißt die Extinktion der Lösungsmittelschicht bei 349 nm gegen reinen Tetrachlorkohlenstoff. Eine Reagentienblindprobe wird mitgeführt. Die Standardprobe enthält 4 mg Aceton/100 ml Wasser. — *Zur Bestimmung von Glykogen und Ketonkörpern in der Leber* gibt man in ein verschließbares, kalibriertes Zentrifugenglas, das 1 ml Wasser

enthält, 25—50 mg Leber, dann 0,4 ml der 10%igen Natriumwolframatlösung und 0,4 ml 0,66 n Schwefelsäure und schüttelt um. Dann füllt man mit Wasser auf 2,0 ml auf, zerstößt das Gewebe vorsichtig mit einem Glasstab, läßt 15 min verschlossen stehen und zentrifugiert 15 min bei 3000 U/min. Zur Bestimmung des Glykogens gibt man 5 Teile 95%iges Äthanol zu 0,8 ml der überstehenden Lösung, schüttelt um, läßt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, zentrifugiert dann 15 min bei 3000 U/min, gießt die überstehende Lösung ab und läßt die Gläser austropfen (10 min). Zu dem abgesetzten Glykogen gibt man 2,0 ml Wasser, schüttelt, bis alles gelöst ist und gibt zu 1 ml dieser Lösung 1,0 ml Wasser und 10,0 ml Anthronreagens. Dann arbeitet man weiter wie bei der Glucosebestimmung. Zur Bestimmung der Ketonkörper arbeitet man mit 0,5 ml der enteiweißten Lösung wie bei der Untersuchung des Blutes. — *Anthronreagens.* Man löst 250 mg Anthron (zur Chromatographie) und 5 g Thioharnstoff in einem Gemisch von 140 ml Wasser und 360 ml konz. Schwefelsäure, erwärmt dabei einige Zeit auf 80—90° C (nicht höher) und bewahrt das Reagens im Kühlschrank auf. — *Chromschwefelsäurereagens.* Man gibt zu 152 ml Wasser und 80 ml konz. Schwefelsäure 80 ml 5%ige wäßrige Kaliumdichromatlösung und dampft das Gemisch auf 240 ml ein.

[1] Scand. J. clin. Lab. Invest. **12**, 18—24 (1960). Biol. Labors of Mecodumex Ltd., Kopenhagen (Dänemark). — [2] J. biol. Chemistry **212**, 335 (1955); vgl. diese Z. **157**, 314 (1955). — [3] Scand. J. clin. Lab. Invest. **11**, 259 (1959); vgl. diese Z. **176**, 317 (1960). URSULA BAUMANN

Über eine Mikromethode der Glykogenbestimmung in kleinsten Mengen von Schistosoma japonica, Paragonimus westermannii, Fasciola hepatica und Eliytrema pancreaticum berichten I-HSÜN TAO, LI-JEN MA, KUO-HAO LIN und KUANG WU[1]. Es handelt sich um eine Modifikation der Anthronmethode von SEIFTER[2]. Es werden durchschnittlich 5 männliche oder 20 weibliche Würmer benötigt. Bei weiblichen Würmern, die Hämoglobinrückstände enthalten, muß die Alkoholfällung durchgeführt werden (indirekte Methode).

[1] Acta biochim. sinica **1**, 218—223 (1958) [Chinesisch]. (Nach engl. Zus.fass. ref.) Shanghai (China). — [2] SEIFTER, S., S. DAYTON, B. NOVIC u. E. MUNTWYLER: Arch. Biochemistry **25**, 191 (1950). B. ROSSMANN

Zur Bestimmung von Glykocyamin im Urin beschreiben M. D. MEZINCESCU, V. V. CIOCILTEU und P. ROSEN[1] ein colorimetrisches Verfahren. Der Urin wird zunächst von Arginin befreit, indem man ihn durch eine Permutitsäule in der Na-Form laufen läßt. Die durch Glykocyamin mit der Sakaguchi-Reaktion hervorgerufene Farbintensität steigt nach der Feststellung der Verff. proportional der Verdünnung des Urins. Die Bestimmung wird demnach so ausgeführt, daß man eine Reihe von steigenden Verdünnungen des Urins mißt und die so erhaltenen Extinktionskoeffizienten auf unendliche Verdünnung extrapoliert. Ausgewertet wird an Hand von gleichartig hergestellten Standardproben. Bei der praktischen Durchführung der Bestimmung sind zahlreiche Einzelheiten sorgfältig zu berücksichtigen, die der sehr ausführlichen Arbeitsvorschrift in der Originalarbeit entnommen werden mögen.

[1] Stud. Cercet. Biochim. **2**, 373—383 (1959) [Rumänisch]. (Mit franz. Zus.fass.) Mediz. Fakultät Bukarest (Rumänien). A. KURTENACKER

Die Identifizierung von chlorierten Pesticiden in tierischen Depotfetten nehmen W. P. MCKINLEY und H. C. GRICE[1] vor. Das tierische Rohfett wird mit trockenem Natriumsulfat bei 8° C gemörsert und mit 60 ml Tetrachlorkohlenstoff 2 Std geschüttelt. Der Extrakt wird durch Fritten filtriert und im Luftstrom bei 60° C

abgedampft. Die letzten 2—3 ml werden bei Zimmertemperatur entfernt. Man wägt das isolierte Fett, unterwirft es der Verteilung im Lösungsmittelsystem n-Hexan-Acetonitril und chromatographiert an einer Florisil-Kolonne. Die gereinigten Eluate werden auf 2—3 ml konzentriert und mit Äthylacetat auf 10 ml verdünnt. Dann weist man die einzelnen Pesticide nach papierchromatographischer Trennung mit dem früher angegebenen System[2] nach. Die erhaltenen R_f-Werte sind in Tabellen wiedergegeben. Verff. verfolgen auf diese Weise den Verbleib von *Kelthan*, *p,p'-DDT*, *Rothan (DDD)* und *Chlorobenzilat* im tierischen Körper. An *Ratten* werden 29 Tage lang entsprechende Diäten verfüttert, dann werden die Tiere getötet, die Organe histologisch untersucht und im Fett, wie oben beschrieben, die Pesticide nachgewiesen.

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **43**, 725—731 (1960). Food a. Drug Labs., Dep. Nat. Health Welfare, Ottawa, Ontario (Canada). — [2] McKinley, W. P., u. J. H. Mahon: J. Assoc. off. agric. Chemists **42**, 725 (1959); vgl. diese Z. **176**, 388 (1960).

Margot Zimmermann

Den Nachweis von biologischen Aminen aus Bakterienkulturen durch Chromatoionophorese, Elektrophorese und Papierchromatographie führen J. Blass, A. Sarraff und M. B. Nicolas[1] durch. Man entfernt die Bakterien aus den Kulturen, bringt die Lösung auf p_H 8,0 und destilliert die *flüchtigen Amine* heraus. Das Destillat neutralisiert man genau mit Schwefelsäure und engt es im Vakuum ein. Man arbeitet die Lösung papierchromatographisch (Whatman-Papier 1 oder 4, imprägniert mit 0,8%iger Natriumacetatlösung, absteigende Chromatographie mit Butanol-Essigsäure-Wasser [125:30:125]) oder elektrophoretisch (Whatman-Papier 1, p_H 4,0, 1,5 Std, 400 V) auf und erreicht mit beiden Methoden eine gute Trennung der primären, sekundären und tertiären Amine. Die Substanzen werden mit den üblichen Reagentien nachgewiesen. Die nach der Destillation verbleibende Lösung wird auf *nichtflüchtige Amine* untersucht, und zwar vor und nach der Hydrolyse (6 n Salzsäure, 24 Std, 110° C). Um hier zu einer sauberen Trennung zu kommen, muß man eine Kombination von Elektrophorese und Chromatographie (Elektroionophorese) anwenden. Man trägt die zu untersuchende Lösung auf ein Blatt Whatman-Papier Nr. 3 (57 × 46,5 cm) auf und chromatographiert absteigend mit Butanol-Essigsäure-Wasser (125:30:125) 24—32 Std. Dann elektrophoresiert man in der anderen Richtung (p_H 8,6, Veronal-Puffer, 400 V, 2—5 Std) und weist die Substanzen mit einer 0,1%igen Ninhydrinlösung in Aceton, der 1% Essigsäure zugesetzt ist, nach. Für einige Amine werden spezifische Nachweisreaktionen verwendet.

[1] J. Chromatogr. (Amsterdam) **3**, 168—177 (1960). Inst. Pasteur, Annexe de Garches, Serv. de Chim. Bactérienne, Garches (Frankreich). Ursula Baumann

Beim Vergleich der Röntgen- und Infrarotspektren der Mesoinosit-monophosphate, die durch chemische[1] oder enzymatische Hydrolyse[2] aus Phytin gewonnen wurden, mit den Spektren des synthetischen *Inosit-2-monophosphates* stellen P. Fleury, A. Desjobert und J. Lecocq[3] deutliche Unterschiede fest. Trotz ähnlicher Eigenschaften (Optische Drehung, Titrationskurve, Hydrolyse, Oxydation, R_f-Wert) handelt es sich also offenbar um verschiedene Substanzen.

[1] Fleurent, P.: Dissertation. — [2] Desjobert, A.: Bull. Soc. Chim. biol. **36**, 1293 (1954). — [3] Bull. Soc. Chim. biol. **42**, 159—160 (1960). Lab. Chim. biol., Fac. de Pharm., Paris (Frankreich). Ursula Baumann

Über die Bestimmung von Cholesterin mit besonderer Berücksichtigung der Anwendung von p-Toluolsulfonsäure berichten L. A. Wright, D. B. Tonks und R. H. Allen[1]. Nach vergleichenden Untersuchungen über mehrere bekannte

Methoden entscheiden sich Verff. für die Methode von S. Pearson, S. Stern und T. H. McGavack[2] zum Routinegebrauch im klinischen Labor, die sie zur Erhöhung der Genauigkeit dahin modifizieren, daß sie das Endvolumen von 2,4 ml auf 6,3 ml erhöhen. — *Ausführung.* Man mischt 0,3 ml Serumprobe mit 0,3 ml Eisessig, 1,2 ml 12%iger p-Toluolsulfonsäurelösung und 4,0 ml Essigsäureanhydrid. Eine Standardprobe wird mit 0,3 ml Cholesterinstandardlösung und 0,3 ml Wasser an Stelle von Eisessig genauso angesetzt. Außerdem stellt man einen Reagensblindwert mit obigen Mengen Wasser, Eisessig, p-Toluolsulfonsäurelösung und Essigsäureanhydrid und einen Serumblindwert mit 0,3 ml Serum und 6 ml p-Toluolsulfonsäurelösung her. Die Ansätze bringt man für 5 min in ein Wasserbad von 25° C und gibt dann außer zum Serumblindwert je 0,5 ml gekühlte konz. Schwefelsäure zu. Nach Mischen beläßt man 20 min in obigem Bad. Probe und Standard mißt man gegen den Reagensblindwert und den Serumblindwert gegen p-Toluolsulfonsäurelösung bei 550 nm nach[2]. An Stelle von p-Toluolsulfonsäure kann man auch Sulfosalicylsäure benutzen.

[1] Clin. Chemistry **6**, 243—253 (1960). Clin. Labs., Lab. Hyg., Dep. Nat. Health Welfare, Ottawa, Ontario (Canada). — [2] Analyt. Chemistry **25**, 813 (1953); vgl. diese Z. **146**, 158 (1955). E. Müller, Würzburg

Die Gesamtcholesterinbestimmung im Serum führt H. Schwarz[1] durch, indem er die Grünfärbung, die Cholesterin mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zeigt, colorimetrisch bestimmt. — *Arbeitsweise.* Man bläst mit einer Mikropipette 0,1 ml Serum in 2 ml eines Alkohol-Äthergemisches (3:1) ein, schüttelt 30 sec und erhitzt 30 sec auf einem siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen filtriert man in ein Reagensglas (quantitativ, das Gefäß wird 3mal mit je 2 ml Alkohol-Äthergemisch ausgespült) und dampft das Filtrat im Vakuum bei 60—70° C zur Trockne ein. Den Rückstand nimmt man in 5 ml Chloroform auf, gibt 1 ml Essigsäureanhydrid und 1 ml einer Mischung von Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure (9:1) zu und stellt die Lösung 15 min in einen Brutschrank (37° C). Sie muß vor Licht geschützt werden. Anschließend kühlt man in Eiswasser ab und mißt die Extinktion bei 610 nm in einer Mikroküvette (0,5 cm Schichtdicke) gegen Wasser mit Filter I-61 (in einem Elko-Colorimeter). Die Färbung bleibt bis zu 20 min konstant. Die Werte werden einer Eichkurve entnommen.

[1] Ärztl. Lab. **6**, 133—134 (1960). Balneolog. Inst., Bad Krozingen.
Ursula Baumann

Ein schnelles Halbmikroverfahren zur Bestimmung von freiem und gesamtem Cholesterin geben A. J. Courchaine, W. H. Miller und D. B. Stein jr.[1] an. Die Arbeitsweise ist nach den Methoden von Zlatkis[2] und Zak[3] modifiziert. — *Ausführung.* Man schüttelt 1 ml Serum 10 sec mit 25 mg festem Silberjodat, um etwa anwesende Bromide zu entfernen, und zentrifugiert 3 min bei 2000 U/min. Genau 0,4 ml des klaren Überstandes gibt man in ein trockenes 10 ml-Meßkölbchen, gibt langsam unter Schütteln 10 ml Gemisch aus Aceton und 95%igem Äthanol (50:50; feuergefährlich!) zu und filtriert durch Whatman-Filter Nr. 2 mit bedecktem Glastrichter. — *Gesamt-Cholesterinbestimmung.* 2,5 ml Filtrat werden in Reagensgläsern (18×150 mm) im siedenden Wasserbad zur Trockne gebracht. Zum Rückstand gibt man 6,0 ml Eisessig und 4,0 ml Eisenchlorid-Reagenslösung (8 ml einer 2,5%igen $FeCl_3 \cdot 6H_2O$-Lösung in konz. Phosphorsäure werden unter Kühlung in fließendem Wasser mit konz. Schwefelsäure auf 100 ml verdünnt). Das Glas wird verschlossen, 5mal umgedreht und bei Zimmertemperatur 10 min stehen gelassen. Dann mißt man die Lösung gegen eine Blindprobe bei 550 nm. Eine Reihe von Standardlösungen wird ebenso behandelt. — *Freies Cholesterin und Ester.* 2,5 ml Filtrat werden in graduierten 15 ml-Zentrifugengläsern im siedenden

Wasserbad auf 0,5—1 ml eingedampft. Dann gibt man 1 ml Digitoninlösung zu (1 g in 50 ml 95%igem Äthanol, mit Wasser verdünnt auf 100 ml), mischt, läßt bei Raumtemperatur 10 min stehen und zentrifugiert 5 min bei 3000 U/min. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und das Glas zum Ablaufen umgekehrt auf Filterpapier gestellt. Der Niederschlag wird mit 4 ml Aceton gewaschen und wieder ablaufen gelassen. Dann versetzt man ihn mit 6,0 ml Eisessig und verfährt weiter wie oben.

[1] Clin. Chemistry **5**, 609—614 (1959). Clin. Lab., Thomas M. Fitzgerald Mercy Hosp., Darby, Pa. (USA). — [2] Zlatkis, A., B. Zak u. A. J. Boyle: J. Lab. clin. Med. **41**, 486 (1953); vgl. diese Z. **148**, 70 (1955/56). — [3] Zak, B., R. C. Dickenman, E. G. White, H. Burnett u. P. J. Cherney: Amer. J. clin. Pathol. **24**, 1307 (1954). Margot Zimmermann

Eine Methode zur Bestimmung des an α- und β-Lipoproteine des Serums gebundenen Cholesterins teilen M. Burstein und J. Samaille[1] mit. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, daß nur β-Lipoproteine mit Heparin in Anwesenheit von Mn^{2+} gefällt werden[2]. — *Ausführung.* 1 ml Serum versetzt man mit 0,04 ml 5%iger Heparinlösung und nach Mischen mit 0,05 ml 1 m Manganchloridlösung. 15 min später zentrifugiert man 10 min mit 6000 U/min und erhält einen gelben Niederschlag sowie einen klaren Überstand, der der „α"-Fraktion entspricht. In dieser Fraktion und im Gesamtserum bestimmt man das Cholesterin und erhält als Differenz den Wert für die „β"-Fraktion. Nach einigen Stunden trübt sich der Überstand, er läßt sich durch Zentrifugieren wieder klären; diese Trübung ist nicht durch Lipoide bedingt. Die normalerweise vorhandenen Mikrofetttröpfchen gehen in die „β"-Fraktion, bei starker Lipämie bilden sie zusammen mit der „β"-Fraktion ein Fetthäutchen an der Oberfläche des Überstandes, und bei mäßiger Lipämie gelingt die Klärung durch Zentrifugieren schwer. Diesen Übelstand kann man beseitigen, indem man das Serum zur Hälfte mit Wasser verdünnt.

[1] Clin. chim. Acta (Amsterdam) **5**, 609 (1960). Centre National de Transfusion, Longuine, Paris (Frankreich). — [2] Burstein, M., u. J. Samaille: Clin. chim. Acta (Amsterdam) **3**, 320 (1958); vgl. diese Z. **171**, 390 (1959/60). — Burstein, M., u. A. Prawerman: C.R. Acad. Sci. **245**, 2559 (1957). E. Müller, Würzburg

Über Bestimmung von Oestrogenen berichtet G. W. Oertel[1]. *Oestron, Oestradiol* oder *Oestriol* löst man in einer geeigneten Menge einer Mischung aus 2 Vol-Teilen konz. Schwefelsäure und 1 Teil Äthanol, erhitzt 10 min im kochenden oder 90 min im Wasserbad von 50—60° C und mißt die Extinktion bei 400, 450 und 500 nm. $E_{450\,max}$ korrigiert man nach W. M. Allen[2] und J. B. Brown[3] gemäß der Formel: $E_{450\,corr.} = 2 \cdot (E_{450} - E_{400} - E_{500})$. Die korrigierte Extinktion bei 450 nm/μg Oestrogen/ml Reagens beträgt für Oestron 0,264 $\pm$ 0,013 ($n = 12$), für Oestradiol 0,241 $\pm$ 0,016 ($n = 12$) und für Oestriol 0,205 $\pm$ 0,010 ($n = 12$). Die Chromogene sind mindestens 1 Std haltbar. Bei Fluorescenzmessungen (0,001 —10,0 μg) regt man mit Licht von 440—450 nm an und mißt bei 487—495 nm.

[1] Naturwissenschaften **47**, 182 (1960). Dpt. Biol. Chemistry, Coll. of Med., Univ. Salt Lake City, Utah (USA). — [2] J. clin. Endocrinol. **10**, 71 (1950). — [3] J. Endocrinology **8**, 196 (1952). E. Müller, Würzburg

Über die Steigerung der Fluorescenz von Progesteron (und anderen Steroiden) in Schwefelsäure berichten J. C. Touchstone und T. Murawec[1]. Verff. untersuchen einschließlich Progesteron 15 Steroide. Die eingedampfte Probe wird mit 0,5 ml 2 n Kalilauge versetzt, 10 min stehen gelassen und 30 min lang auf 60° C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 5,0 ml 88%ige Schwefelsäure zugefügt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen (Progesteron) oder auf 120° C erhitzt

(17-Hydroxyprogesteron). Die optimale Erhitzungsdauer ist je nach Steroid verschieden. Viele der geprüften Verbindungen zeigen bei diesem Verfahren eine bedeutend intensivere Fluorescenz als ohne Laugenvorbehandlung; bei Progesteron ist sie 100fach. Bei den Oestrogenen ist die Fluorescenz nach dieser Vorbehandlung vermindert. Die Ergebnisse sind mit 3 Kurven belegt und in einer Tabelle zusammengestellt.

[1] Analyt. Chemistry **32**, 822—824 (1960). Dpt. Obstetrics and Gynecology, School of Med., Univ. Philadelphia, Pa. (USA). E. MÜLLER, Würzburg

Über die Analyse von Diäthylstilböstrollösungen in Öl berichtet D. BANES[1]. Es handelt sich um eine Adaptation der vom Verf. für Tabletten angegebenen Bestrahlungsmethode[2] an die Gegebenheiten bei der Untersuchung von Lösungen des Steroids in Öl. Außerdem benutzt Verf. die früher zur Bestimmung von Diäthylstilböstrol angegebene Nitrierungsmethode[3] dazu, die Gesamtphenole zu bestimmen. Die Originalvorschriften[2,3] mit ihren Modifikationen für den in Frage stehenden Zweck sind in allen Einzelheiten ausführlich angegeben.

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **43**, 248—250 (1960). Bureau Biol. Physic. Sci., Food and Drug Administ., Dept. Health, Educat., Welfare, Washington, D.C. (USA). — [2] BANES, D.: J. Assoc. off. agric. Chemists **42**, 464 (1959). — [3] Official Methods of Analysis, 8th. Ed. A.O.A.C., Washington, D.C. 32. 127-29, (1955).
E. MÜLLER, Würzburg

Die Bestimmung von Pregnantriol und 17-Hydroxypregnanolon im Urin von Patienten mit angeborener Nebennierenhyperplasie führen M. BELL und H. VARLEY[1] nach einer Methode durch, die der von STERN[2] zum Nachweis von Pregnantriol entspricht. 17-Hydroxypergnanolon wird dadurch erfaßt, daß es mit Borhydrid zum Pregnantriol (allerdings nicht quantitativ, sondern nur zu 75%) reduziert wird. — *Arbeitsweise.* $^1/_{100}$ des 24 Std-Urins wird auf 20 ml (bei einer Gesamtmenge von mehr als 1 l), bzw. 10 ml (bei weniger als 1 l) verdünnt und mit 5 g festem Ammoniumsulfat/10 ml versetzt. Man schüttelt um und extrahiert die Lösung in einem Scheidetrichter 3mal mit dem halben Volumen Äther/Äthanol (3:1). Man dampft die vereinigten Extrakte im Vakuum auf dem Wasserbad zur Trockne ein. Den Rückstand nimmt man in 10 ml 0,1 m Ammoniumacetat-Pufferlösung p_H 5 auf (7,7 g Ammoniumacetat in 1 l Wasser gelöst und mit Eisessig auf p_H 5 eingestellt), überführt die Lösung quantitativ in ein Zentrifugenglas, setzt 1 ml „Ketodase" (enthält 5000 Glucuronidase-Einheiten) zu und inkubiert 4 Std bei 37° C. Nach dem Abkühlen extrahiert man die Mischung 3 mal mit je 10 ml Benzol, trennt die Schichten durch Zentrifugieren und wäscht die vereinigten Benzolextrakte in einem Scheidetrichter 2mal mit je 10 ml NaOH-NaCl-Lösung (25% NaCl in 1,0 n Natronlauge) und 2mal mit Wasser. Die Extrakte verwendet man entweder insgesamt oder nach Einengen auf 5—10 ml zur Chromatographie. Diese wird an einer Aluminiumoxydsäule durchgeführt (10 mm ∅, gefüllt mit 2,5 g Aluminiumoxyd, abgedeckt mit einer 5 mm-Schicht säuregewaschenem Sand, mit Benzol befeuchtet). Man bringt den Extrakt auf, wäscht mit 25 ml 0,8%iger Äthanollösung in Benzol nach und eluiert dann zunächst *Pregnandiol* mit 12 ml 3%iger Äthanollösung in Benzol, dann *Pregnantriol* mit 12 ml 10%iger Äthanollösung in Benzol. Man dampft die Eluate im Vakuum zur Trockne ein, trocknet die Rückstände 1 Std im Exsiccator und nimmt sie dann in 3 ml konz. Schwefelsäure auf. Man stellt die Proben in ein Wasserbad von 25° C. Die Farbentwicklung dauert bei Pregnandiol 17, bei Pregnantriol 1 Std. Bei zu hohen Konzentrationen nimmt man den Rückstand in Äthanol auf, dampft einen aliquoten Teil ein und gibt dann die Schwefelsäure zu. Man mißt die Extinktion bei 400, 435 und 470 nm. Gleichzeitig ermittelt man die Extinktionen für eine Standardlösung, die 0,02 mg Pregnantriol bzw. -diol enthält.

Die Ablesungen werden nach folgender Formel korrigiert: 2 mal Extinktion 435 nm — (Extinktion 400 nm + Extinktion 470 nm). Die Konzentration errechnet sich dann nach der Formel: Korrigierte Extinktion Test/Korrigierte Extinktion Standard mal 2 mg/24 Std — Probe. — Zur *Pregnanolon*bestimmung versetzt man den verdünnten Urin mit 5 mg Borhydrid/ml (1 ml frisch bereitete Borhydridlösung, die 100 mg/ml Wasser enthält, auf 20 ml verdünnten Urin), läßt das lose verschlossene Gefäß über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und arbeitet dann weiter wie oben beschrieben.

[1] Clin. chim. Acta (Amsterdam) **5**, 396—405 (1960). Dept. Clin. Pathol., Manchester Royal Infirmary, Manchester (England). — [2] STERN, M. I.: J. Endocrinol. **16**, 180 (1957). URSULA BAUMANN

Eine verbesserte Methode zur Isolierung und Bestimmung von Furan-2,5-dicarbonsäure im menschlichen Harn geben B. FLASCHENTRÄGER und S. M. ABDEL WAHHAB[1] an. Es handelt sich um eine Modifikation der Methoden von B. FLASCHENTRÄGER und K. BERNHARD[2], sowie von B. FLASCHENTRÄGER, B. CAGIANUT und F. MEIER[3], die im wesentlichen in einer Adaptation des von B. FLASCHENTRÄGER und P. B. MÜLLER[4] angegebenen Flüssigkeitextraktionsapparates besteht. Die neue Apparatur ist im Schnittbild mit genauen Maßen abgebildet. Verff. finden bei gesunden Erwachsenen 4—5 mg/Tag der Säure, bei Kindern fehlt sie, womit ältere Befunde bestätigt werden.

[1] Mikrochim. Acta (Wien) **1960**, 275—281. Biochem. Dpt., Fac. of Med. and Chem. Dpt., Fac. of Sci. Alexandria Univ., Ägypten (UAR). — [2] Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **246**, 124 (1937). — [3] Helv. chim. Acta **28**, 1489 (1945). — [4] Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **251**, 52 (1938). E. MÜLLER, Würzburg

Ein neues Verfahren zur Bestimmung des gesamten im Organismus enthaltenen Blutfarbstoffes teilen H. D. WALLER und W. SCHMIDTS[1] mit. Es beruht auf der Kohlenoxydinhalationsmethode. Im geschlossenen Respirationssystem werden dem Sauerstoff 15—30 ml Kohlenstoffmonoxyd zugesetzt. Die dabei auftretenden Kohlenoxydhämoglobinkonzentrationen von 2—3% sind für die Versuchsperson ungefährlich. Aus dem Respirationssystem werden automatisch kleine Proben entnommen, in denen das Kohlenstoffmonoxyd durch Jodpentoxyd bei 150° C zum Dioxyd oxydiert wird, das seinerseits in 0,004 n Natronlauge eingeleitet wird. In der Natronlauge wird vor und nach Einleiten von CO_2 die Leitfähigkeit gemessen und das Resultat in Volumen-Prozent CO von einem Kompensationsschreiber registriert. Mit bekannten Gleichungen läßt sich das Gesamthämoglobin berechnen und nach Bestimmung der Hämoglobinkonzentration auch das totale Blutvolumen. Das Verfahren erfordert 43—45 min und weist einen Fehler von ± 3,4% auf. Die Methode ist genau beschrieben und die Apparatur bzw. Schaltung in schematischen Abbildungen wiedergegeben.

[1] Klin. Wschr. **38**, 483—487 (1960). Med. Univ.-Klinik Marburg/Lahn. E. MÜLLER, Würzburg

Zur Hämoglobinbestimmung schlägt G. MINOW[1] die *Cyanhämoglobinmethode* vor. Sie ist unkompliziert und erfordert keine ausgefallenen Chemikalien. Die Eichkurve kann mit einem jetzt fabrikmäßig hergestellten Standard (Asid-Werke) aufgestellt werden. Dagegen ist es bisher noch nicht gelungen, mit der Sahli-Methode einwandfrei reproduzierbare Werte zu erzielen.

[1] Röntgen- u. Lab.-Praxis **13**, L 108—L 109 (1960). Landeslehranstalt f. med.-techn. Assistenten, Berlin. URSULA BAUMANN